

鉛による血管内皮修復の阻害とその機序に関する研究

著者	藤原 泰之
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	406
URL	http://hdl.handle.net/10097/46026

鉛による血管内皮修復の阻害と
その機序に関する研究

藤 原 泰 之

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

- 1 . Kaji, T., **Fujiwara, Y.**, Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1994) Stimulation by zinc of cultured vascular endothelial cell proliferation: possible involvement of endogenous basic fibroblast growth factor. *Life Sci.*, 55, 1781-1787.
- 2 . Kaji, T., **Fujiwara, Y.**, Hoshino, M., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1995) Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*, 95, 87-92.
- 3 . Kaji, T., **Fujiwara, Y.**, Sakurai, S., Yamamoto, C., Kozuka, H. and Koizumi, F. (1995) Zinc promotes the repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 89, 189-198.
- 4 . **Fujiwara, Y.**, Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1995) Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology*, 98, 105-110.
- 5 . **Fujiwara, Y.**, Kaji, T., Sakurai, S., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1997) Inhibitory effect of lead on the repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*, 117, 193-198.
- 6 . **Fujiwara, Y.** and Kaji, T. (1997) Zinc potentiates the stimulation by basic and acidic fibroblast growth factors on the proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 97, 95-106.
- 7 . **Fujiwara, Y.**, Watanabe, S., Sakamoto, M. and Kaji, T. (1998) Repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells after simultaneous exposure to lead and zinc. *Toxicol. Lett.*, 94, 181-188.
- 8 . **Fujiwara, Y.** and Kaji, T. (1999) Possible mechanism for lead inhibition of vascular endothelial cell proliferation: a lower response to basic fibroblast growth factor through inhibition of heparan sulfate synthesis. *Toxicology*, in press.
- 9 . **Fujiwara, Y.** and Kaji, T. (1999) Lead inhibits the core protein synthesis of a large heparan sulfate proteoglycan perlecan by proliferating vascular endothelial cells in culture. *Toxicology*, in press.

目次

緒言	1
第Ⅰ章 鉛による血管内皮修復の阻害	5
第1節 鉛による内皮修復の阻害	6
第2節 鉛による内皮増殖の阻害	9
第3節 鉛による血管平滑筋細胞増殖の促進	13
第4節 考察	17
第Ⅱ章 鉛による内皮増殖の阻害機序	21
第1節 bFGF の活性発現に対する鉛の作用	22
第2節 鉛による HSPGs の変化	26
第3節 考察	32
第Ⅲ章 内皮修復に対する鉛と亜鉛の相互作用	35
第1節 亜鉛による内皮修復の促進とその特性	36
第2節 亜鉛の傷害内皮修復促進作用に対する鉛の阻害作用	41
第3節 考察	46
結論	48
謝辞	50
第Ⅳ章 実験の部	51
1. 実験材料	51
2. 細胞数の計測および細胞毒性	52

3.	DNAおよび蛋白合成	5 3
4.	形態学的観察	5 4
5.	傷害内皮細胞層の修復	5 4
6.	bFGF の定量	5 4
7.	細胞表面の HSPGs および FGF レセプターへの bFGF の結合	5 5
8.	血管内皮細胞グリコサミノグリカンへの[³ H]グルコサミン および[³⁵ S]硫酸の取り込み	5 5
9.	血管内皮細胞プロテオグリカンの解析	5 6
9.1.	血管内皮細胞プロテオグリカンの抽出	5 6
9.2.	DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィーによる内皮細胞 プロテオグリカンの分離およびゲルろ過による内皮細胞 HSPGs の 分析	5 7
9.3.	コア蛋白の分析	5 8
10.	細胞内金属量およびメタロチオネイン量	5 9
11.	統計学的処理	6 0
	引用文献	6 1

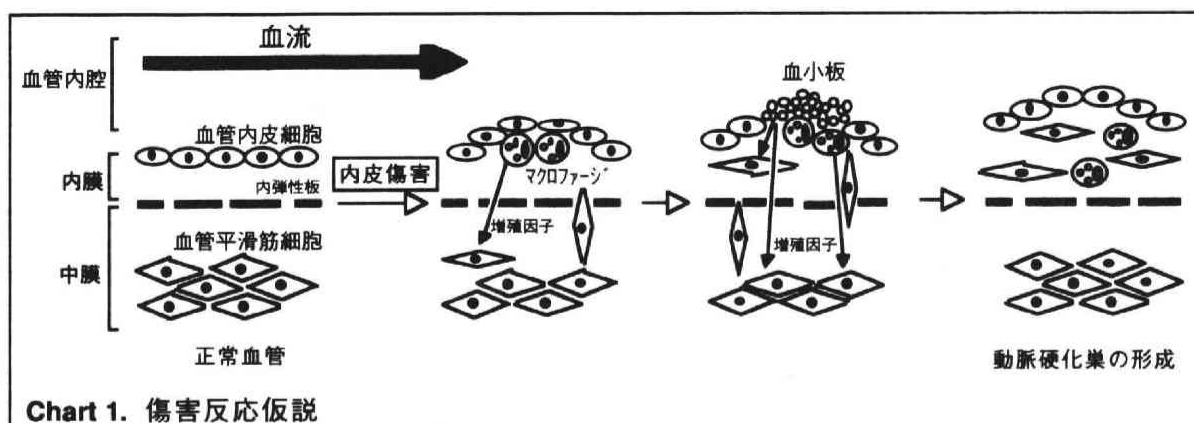
略語

本論文に用いた略語は、以下の通りである。

aFGF	Acidic fibroblast growth factor	酸性線維芽細胞増殖因子
bFGF	Basic fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
BSA	Bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
CMF-PBS	Ca ²⁺ , Mg-free phosphate-buffered saline	Ca, Mg 不含リン酸緩衝液
CPC	Cetylpyridinium chloride	塩化セチルピリニジニウム
CS/DS PGs	Chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans	コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸プロテオグリカン
DEAE	Diethylaminoethyl	ジエチルアミノエチル
DMEM	Dulbecco's modified Eagles' medium	ダルベッコ変法イーグル培地
FBS	Fetal bovine serum	牛胎児血清
HSPGs	Heparan sulfate proteoglycans	ヘパラン硫酸プロテオグリカン
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
MTT	3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasolium bromide	
PDGF	Platelet-derived growth factor	血小板由来増殖因子
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	フェニルメタンスルホニルフルオリド
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640	
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
Tris base	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	トリスハイドロキシメチルアミノメタン
Vo	Void volume	
Vt	Total volume	

緒言

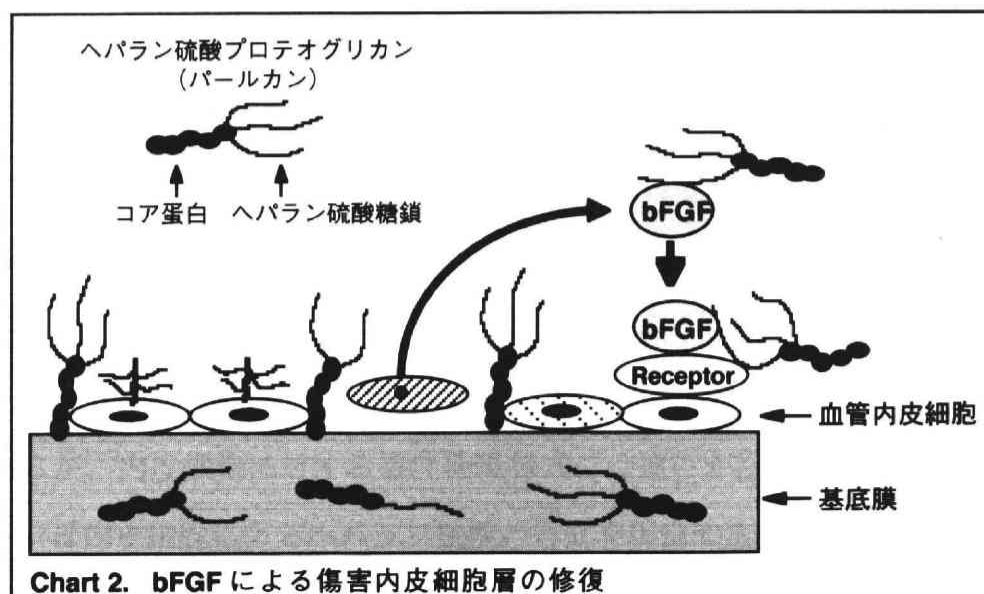
動脈硬化病変に基づく重要臓器の梗塞死（心筋梗塞や脳梗塞）は我が国においては今や癌に次いで死因の第2位を占めており、その発症機序の分子レベルでの解明が急務となっている。成人の体内にある全ての血管の総延長は推定で10万kmにもおよび、血管が我々の身体の中で占める重要性は極めて高い。この血管の内側を裏張りしている細胞が血管内皮細胞であり、ただ一層で血管内腔を覆っている。血管内皮細胞は直接血液と接している細胞種であり、単に血液と内皮下組織とを隔てる障壁として機能しているだけでなく様々な因子を産生・放出し、血管と血液の恒常性の維持に寄与している。血管内皮細胞は血小板の粘着・凝集を抑制するプロスタサイクリン（Revtyak et al., 1987）、線溶系を調節する組織プラスミノーゲンアクチベーター（Levin and Loskutoff, 1982）およびその阻害因子であるプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター1（Gelehrter and Sznycer-Laszuk, 1986）、ヘパリン様活性を有するヘパラン硫酸（Marcum and Rosenberg, 1985）、トロンビンとの不活性型複合体の形成を通じてプロテインCを活性化して凝固カスケードの進行を阻害するトロンボモジュリン（Esmon and Owen, 1981）、さらに一酸化窒素（NO）を本体とする内皮細胞由来弛緩因子（Moncada et al., 1988）および持続的血管収縮因子エンドセリン（Yanagisawa et al., 1988）等を産生し、血液凝固線溶系および血管のトーンスの調節に積極的に関与している。一方、血管内皮細胞は種々の侵襲に常時さらされており、侵襲に対する過剰防衛反応の結果として血管平滑筋細胞の増生、血管内膜の細胞外マトリックスの増加および細胞内外へのリポ蛋白・コレステロールの沈着を特徴とする動脈硬化巣が形成される。動脈硬化病変の発症・進展および形成のメカニズムの詳細は、Ross（1993）によって「傷害反応仮説」としてまとめられている（Chart 1）。それによると、血管内皮細胞の慢性的な物理・機械的傷害が生じると血管内皮細胞のターンオーバーの亢進や内皮下組織への単球の進入がおこる。内膜に進入した単球はマクロファージへと分化して変性した脂質



を取り込んで泡沫化するが、この泡沫細胞は血管平滑筋細胞に対する遊走・増殖因子である血小板由来増殖因子（PDGF）をはじめとする種々の因子を放出し、血管平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖を促す。さらに、血管内皮細胞が剥離するような傷害が加わると血管壁の抗血栓性が失われ、血小板の活性作用を有する内皮下組織が血液と直に接することになるので血小板の粘着・凝集が起こり、このとき血小板より PDGF をはじめとする血管平滑筋細胞遊走・増殖因子が大規模に放出され、血管平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖が加速され、血管内膜の肥厚斑（動脈硬化巣）が形成される。従って、血管内皮細胞の傷害あるいは機能障害を惹起する因子は動脈硬化病変の危険因子であり、また動脈硬化病変発症の理解には、その初期段階としての危険因子による内皮機能障害の解明が不可欠である。

血管内皮細胞は塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を産生し、自らの遊走（Sato and Rifkin, 1988）および増殖（Schweigerer et al., 1987）を刺激することが知られているが、bFGF 分子中にはシグナル配列がなく、主として内皮細胞が重篤に傷害されたときや死に至ったときに細胞から逸脱して近傍の内皮細胞に作用するとされる（Rifkin and Moscatelli, 1989）。また、傷害された内皮細胞層の修復が抗 bFGF 中和抗体によってほぼ完全に阻害される（Sato and Rifkin, 1988）ことから、bFGF は血管壁の修復において中心的な役割を果たしていると考えられる。動脈硬化病変の防御には正常な内皮細胞層の維持が重要であるので、内皮細胞が傷害を受

けた場合には bFGF の活性が十分に発揮され、内皮修復が速やかに行われなければならない。bFGF の活性発現は細胞内チロシンキナーゼ領域をもつ FGF レセプターによって介在される (Givol and Yayon, 1992; Johnson and Williams, 1993; Jaye et al., 1992) が、bFGF の FGF レセプターへの結合とその活性発現には、内皮細胞が産生するヘパラン硫酸糖鎖が必須的な役割を果たしている (Yayon et al., 1991; Rapraeger et al., 1991; Ornitz et al., 1992) (Chart 2)。ヘパラン硫酸はヘパリンと類似した基本骨格を有するグリコサミノグリカンであり (Nader et al., 1987)、コア蛋白と呼ばれる蛋白骨格に共有結合してヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) 分子として存在している (Hook et al., 1984)。内皮細胞は、いくつかの HSPG 分子種の産生能を有しているが、その主要産物は大型分子種パールカンであり、他の分子種の産生は量的には僅かである (Marcum et al., 1986)。しかも bFGF の FGF レセプターへの結合を促進するのはパールカンのヘパラン硫酸糖鎖だけであり、他の分子種のヘパラン硫酸糖鎖はこの促進に対して拮抗的に働く (Aviezer et al., 1994a; Aviezer et al., 1994b)。従って、内皮細胞が産生するパールカンおよび他の HSPG 分子種の量的構造的変化は、この細胞種に対する bFGF の活性発現の異常を通じて血管病変誘発の要因になり得る。



ところで、環境汚染物質である鉛は、疫学的調査や動物実験において動脈硬化症を含む血管病変を誘発する因子であることが古くから指摘されてきた重金属である (Dingwall-Fordyce and Lane, 1963; Revis et al., 1981; Schwartz, 1991) が、鉛による血管病変発症機序はほとんど明らかにされていない。著者が所属する研究室では、血管組織を構成する細胞、特に内皮細胞に対する鉛の影響を検討し、鉛の細胞毒性は低く内皮細胞の単層維持は影響を受けない (Kaji et al., 1995) ものの、増殖静止期の内皮細胞からの組織プラスミノゲンアクチベーター (Kaji et al., 1992a) の分泌およびヘパラン硫酸 (Kaji et al., 1991) の産生が鉛によって著しく阻害されることなどを明らかにしてきた。これらの知見は、鉛が血管病変に関連する内皮細胞機能を障害し得ることを示唆しているが、鉛による血管病変、特に動脈硬化病変の発症機序を十分に理解するためには、内皮修復とその重要な構成部分である内皮増殖に対する鉛の影響を詳細に検討する必要があると考えられる。

そこで本研究は、鉛による動脈硬化病変の発症・進展機構の解明に寄与することを目的として、血管内皮細胞層の維持に重要な内皮細胞層の修復と増殖に対する鉛の毒性およびその発現機序を細胞培養系を用いて検討するとともに、血管平滑筋細胞の増殖に対する鉛の作用についても検討を加えた。

第I章 鉛による血管内皮修復の阻害

血液は正常に血管内を循環しているときは凝固することはないが、血管が破綻した場合には速やかに凝固し止血する。このような巧妙な仕組みの中心的な役割を担っているのが血管内皮細胞であり、この細胞は様々な因子を産生・放出し、凝固、抗凝固、線溶の一連の調節に積極的に関与している。血管は通常は抗凝固・線溶促進機能が優位にあるため血管内凝固は起こらないが、内皮傷害が大規模であったり頻回に起こったりすると、止血応答として血液は凝固促進性となり、血小板の粘着・凝集が引き起こされる。このような状態では、血管中膜の血管平滑筋細胞は主として血小板やマクロファージに由来する血小板由来増殖因子（PDGF）（Ross et al., 1986）や形質転換増殖因子 β （Assoian and Sporn, 1986）などの増殖因子に曝露することになり、中膜から内膜への遊走と内膜での異常増殖が惹起され、そのような血管平滑筋細胞によって産生された細胞外マトリックスが血管内膜に過剰に沈着し動脈硬化巣が形成される（Ross and Glomset, 1976; Ross, 1993）。従って、動脈硬化病変の発症を防御するためには正常な内皮細胞層の維持が重要であり、内皮細胞が傷害を受けた場合には内皮修復が速やかに行われなければならない。

カドミウムは鉛と同じく血管病変を誘発するとされる重金属である（Revis et al., 1981; Houtman, 1993; Carroll, 1966）。内皮細胞はカドミウムに対して高い感受性を示し（Kaji et al., 1996a）、カドミウムに曝露した内皮細胞層は容易に空隙を発生する（Kaji et al., 1992b）が、この空隙は単にカドミウムの細胞毒性による細胞死の増加だけではなく、その修復に必要な増殖が阻害されることにも起因する。一方、鉛には内皮細胞層に直接的に空隙を発生させるような強い細胞毒性は認められない（Kaji et al., 1995）。カドミウムおよび鉛はともに血管病変を誘発し得る重金属であるが、内皮細胞に対する毒性発現様式には違いが認められる。すなわち、カドミウムは内皮細胞によるヘパラン硫酸の合成を促進する（Kaji et al., 1994b）のに対し、鉛はこれを阻害する（Kaji et al., 1991）。また、カドミウムがプラスミ

ノーゲンアクチベーターインヒビター 1 の分泌促進を介して液相の線溶活性を低下させる (Yamamoto et al., 1993) のに対し、鉛は組織プラスミノゲンアクチベーターの分泌を阻害することによってその活性を低下させる (Kaji et al., 1992a) 。これらの結果から、内皮細胞層の維持に対しても鉛がカドミウムとは異なった様式で作用し得る可能性が考えられた。すなわち、内皮細胞層は鉛によって容易に傷害されないが、その修復過程は鉛によって強く阻害される可能性が考えられる。

そこで、本章では血管内皮細胞の培養系を用いて、内皮細胞層傷害後の修復に対する鉛の作用を調べ、さらに修復の重要な構成部分である内皮増殖に対する作用について検討した。また、動脈硬化巣の主要構成細胞である血管平滑筋細胞の増殖に対する鉛の作用についても検討を加えた。

第 1 節 鉛による内皮修復の阻害

血管内皮細胞の修復能および遊走能測定法として、Wound assay 法がよく用いられている (Burk, 1973; Sato and Rifkin, 1988; Murugesan et al., 1993; Sa and Fox, 1994) 。これは、飽和密度に達した (コンフルエントの) 内皮細胞層の一部をラバーポリスマンやかみそりなどで水平にはがし、培養後その部分に現れた内皮細胞の遊走した距離や内皮細胞の数で修復を定量化する方法である。本論文においては、コンフルエントの内皮細胞を調製し、かみそりの刃をウエルの中央部の裏側にあらかじめ引いた基線に垂直に押し当て、かみそりのエッジに沿ってラバーポリスマンで細胞層の半面を削り取り、削り取った細胞を完全に取り除いた後、残った細胞を新鮮な無血清培地中で重金属等で処理し、処理終了後、細胞をギムザ液染色し、基線付近の形態学的な観察と基線を越えて傷害部位に現れた細胞数を計測して修復を評価した。

Fig. I-1 に、傷害血管内皮細胞層の修復に対する鉛の作用を形態学的に評価した結果を示す。傷害内皮の修復は、非傷害部位からの内皮細胞の遊走と傷害部位に

おける内皮細胞の増殖によって行われるが、48 時間後において、基線を越えて傷害部位に現れた内皮細胞を観察したところ、鉛による濃度依存的な細胞数の減少が認められた。この時、鉛による細胞の退行性変化は認められなかった。そこで、傷害部位に現れた細胞数を計測したところ、Fig. I-2 に示すように、1 μM 以上の鉛によって内皮細胞数の有意な減少が認められ、形態学的観察の結果と一致した。これらの結果は、鉛が傷害された内皮細胞層の修復を阻害することを示唆している。

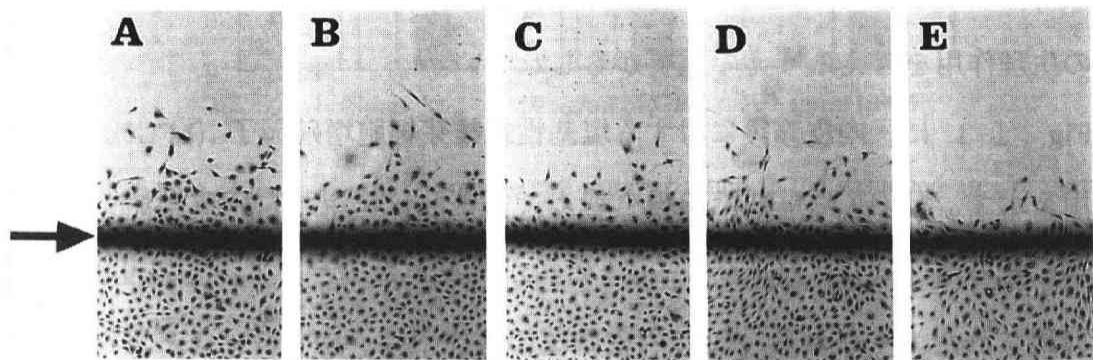


Fig. I-1. Morphological observation of the wounded edge of vascular endothelial cell cultures. Confluent cultures of bovine aortic endothelial cells were wounded and incubated at 37°C for 48 h in the presence of lead nitrate at 0.5, 1.0, 2.0 or 5.0 μM . Giemsa stain (x 40). (A) Control; (B) lead (0.5 μM) treatment; (C) lead (1.0 μM) treatment; (D) lead (2.0 μM) treatment; (E) lead (5.0 μM) treatment. An arrow indicates the wounded edge.

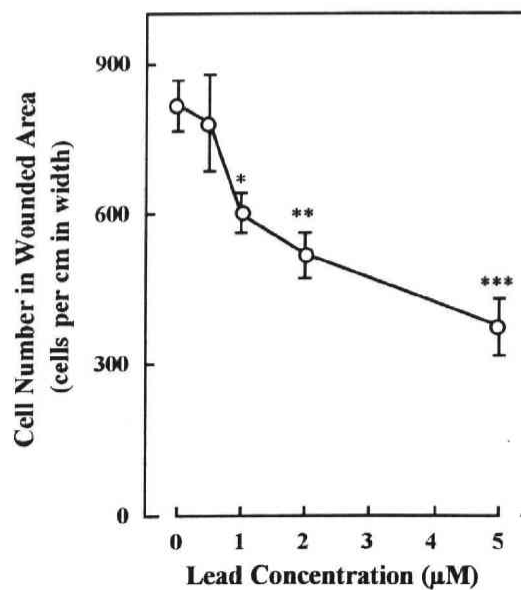


Fig. I-2. Effect of lead on the cell number found in the wounded area of cultured vascular endothelial cell layer. Confluent cultures of bovine aortic endothelial cells were wounded and incubated at 37°C for 48 h in the presence of lead nitrate at 0.5, 1.0, 2.0 or 5.0 μM . Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

次に、鉛以外のカチオンによる内皮修復に対する作用を検討し、鉛の作用と比較した。Table I-1 に示すように、5 μM の鉛が傷害部位に現れた内皮細胞数を有意に減少させたのに対し、同濃度の亜鉛はその細胞数を有意に増加させた。ビスマス、コバルト、マンガンおよびニッケル（全て 5 μM ）による有意な変化は認められなかった。これらの結果から、内皮修復に対する阻害作用は、他の重金属にはない鉛に特有の作用である可能性が考えられる。なお、本検討において、亜鉛が鉛とは対照的に内皮修復を促進することが示唆されたが、本知見は必須微量元素である亜鉛の生理作用を考えるうえで重要かもしれない。

Fig. I-3 に、内皮修復に対する塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）と鉛の相互作用を示す。bFGF は単独で基線を越えて傷害部位に現れた内皮細胞数を増加させたが、その増加は 1 および 5 μM の鉛が共存することによって濃度依存的に有意に抑制された。すなわち、鉛の内皮修復阻害作用は、bFGF による促進に対しても認められた。

Table I-1

Effect of lead, zinc, bismuth, cobalt, manganese and nickel on the cell number found in the wounded area of cultured vascular endothelial cell layer

	Cell number in the wounded area (cells per cm in width)
Control	642 \pm 48
Lead	359 \pm 24***
Zinc	823 \pm 50*
Bismuth	646 \pm 49
Cobalt	675 \pm 21
Manganese	666 \pm 19
Nickel	551 \pm 37

Confluent cultures of bovine aortic endothelial cells were wounded and incubated at 37°C for 48 h in the presence of lead nitrate, zinc sulfate, bismuth nitrate, cobalt chloride, manganese chloride or nickel chloride at 5.0 μM each. Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the control, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

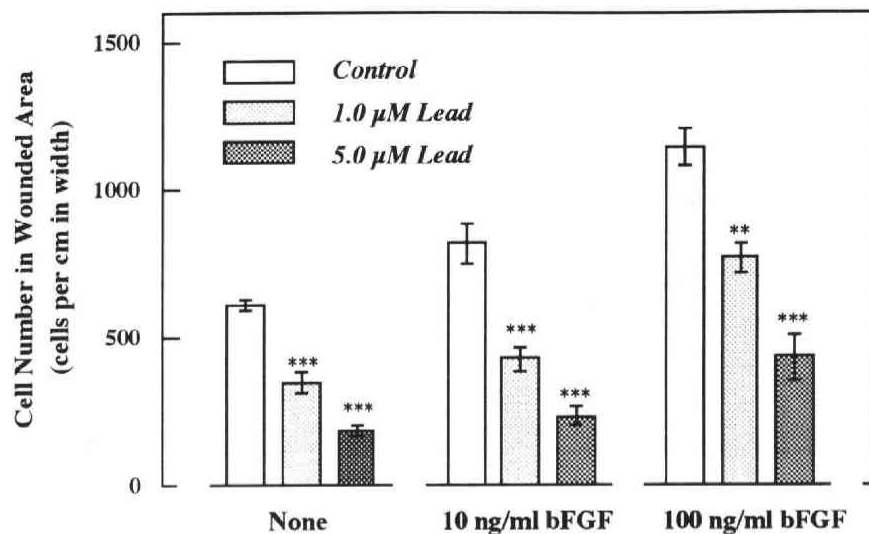


Fig. I-3. Interaction of lead with bFGF on the cell number found in the wounded area of cultured vascular endothelial cell layer. Confluent cultures of bovine aortic endothelial cells were wounded and incubated at 37°C for 48 h in the presence of lead nitrate at 1.0 or 5.0 μ M combined with or without bFGF at 10 or 100 ng/ml. Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

第2節 鉛による内皮増殖の阻害

前節において傷害された内皮細胞層の修復を鉛が阻害することが示されたが、この阻害作用は内皮細胞増殖の阻害と内皮細胞に対する非特異的な細胞毒性に起因する可能性が考えられる。そこでまず、血管内皮細胞の増殖に対する鉛の作用を検討した。Fig. I-4 に内皮細胞数および内皮細胞酸不溶性画分への $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みに対する鉛の作用を示す。増殖期の内皮細胞に対し、0.5 μ M 以上の鉛は 24 時間処理後の細胞数を有意に減少させた。またこれに相似的に、DNA 合成の指標である $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みも鉛によって有意に減少した。すなわち、鉛が内皮細胞の増殖を強く阻害することが示された。しかしながら、Table I-2に示すように、非特異的な細胞傷害の指標として培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定したところ、5 μ M の鉛による有意な変化は認められず、鉛による内皮増殖阻害作用が非特異的な細胞傷害によるものではないことが示された。

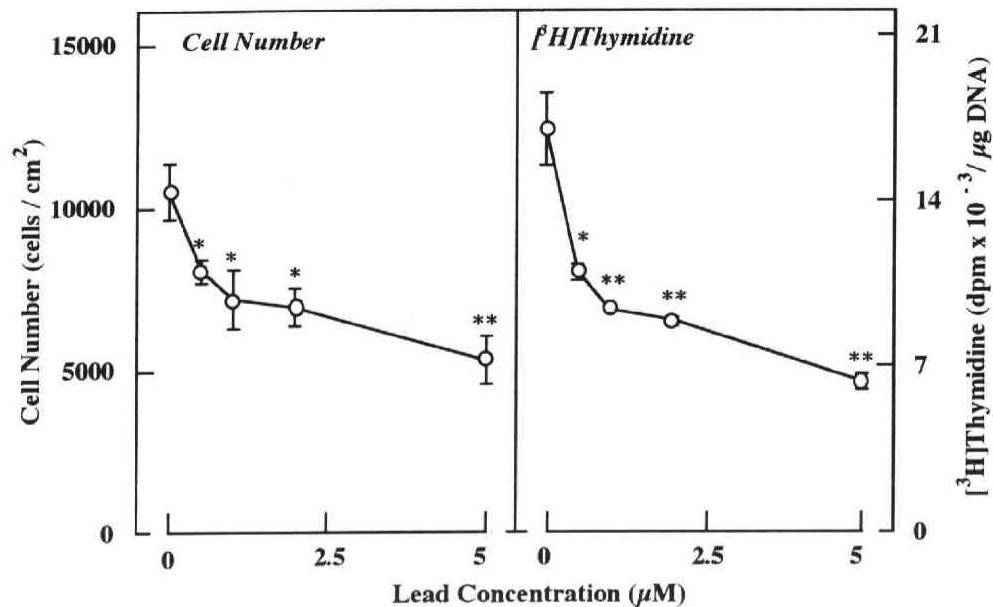


Fig. I -4. Effect of lead on the cell number (left panel) and the incorporation of [³H]thymidine into the acid-insoluble fraction (right panel) of cultured vascular endothelial cells. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 0.5, 1.0, 2.0 or 5.0 μM and labeled with or without [³H]thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of four and five samples in the left panel and the right panel, respectively. Significantly different from the corresponding control, **P*<0.05; ***P*<0.01.

Table I -2

Effect of lead on the leakage of LDH into the medium from cultured vascular endothelial cells

Lead nitrate (μM)	LDH activity (IU/L)
Control	13.36 ± 2.17
0.5	11.74 ± 1.20
1.0	10.56 ± 0.89
2.0	11.11 ± 1.02
5.0	12.22 ± 1.17

Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 0.5, 1.0, 2.0 or 5.0 μM. Values are means ± S.E. of four samples.

次に、鉛に曝露した増殖期の血管内皮細胞の形態学的観察を行ったところ、Fig. I -5 に示すように、形態学的にも鉛による細胞数の減少が認められた。また、鉛の濃度に依存した紡錘形の細胞の増加と、5 μM の鉛処理による僅かに変性した

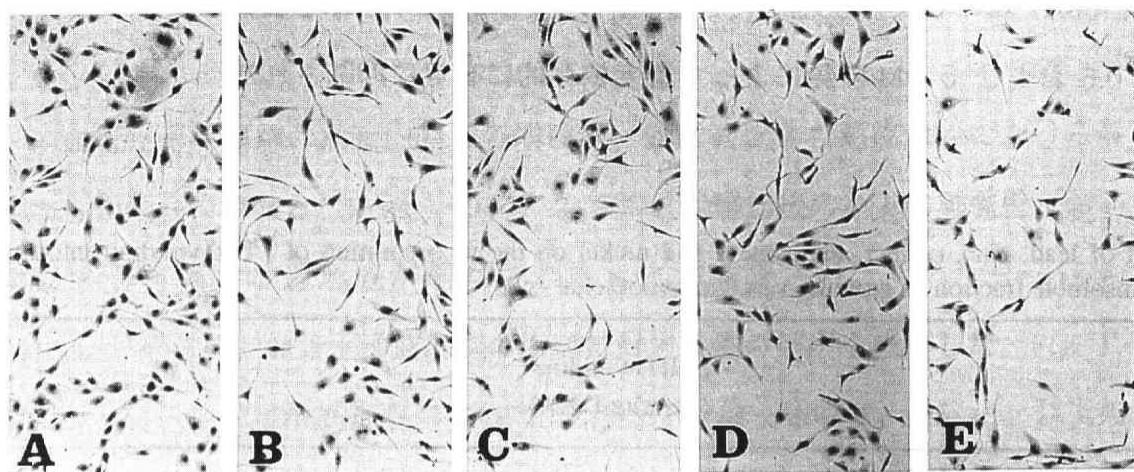


Fig. I-5. Morphological observation of cultured vascular endothelial cells treated with lead. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 0.5, 1.0, 2.0 or 5.0 μ M. Giemsa stain ($\times 100$). (A) Control: scattered cells growing with a regular morphology. (B) Lead (0.5 μ M) treatment: a slight appearance of spindle-shaped cells. (C) Lead (1.0 μ M) treatment: a decrease on cell number with an increase in the spindle-shaped cells. (D) Lead (2.0 μ M) treatment: a marked decrease in cell number. (E) Lead (5.0 μ M) treatment: an appearance of necrotic changes in the spindle-shaped cells.

細胞が観察されたが、全体的には細胞の強い変性は認められなかった。従って、鉛による傷害内皮細胞層の修復阻害作用は、主として内皮細胞の増殖が阻害されることによるものと考えられる。

Table I-3 に、内皮細胞酸不溶性画分への ^3H チミジンの取り込みに対する鉛以外の重金属による影響を検討した結果を示す。10 μ M の鉛が ^3H チミジンの取り込みを有意に減少させたのに対し、同濃度の亜鉛はその取り込みを有意に増加させた。銅、マンガンおよびニッケル（全て 10 μ M）処理では ^3H チミジンの取り込みに有意な変化は認められなかった。従って、鉛は内皮細胞の増殖を阻害する特有な重金属であり、内皮増殖の阻害は重金属に一般的な作用ではないことが示された。また、亜鉛が内皮増殖の刺激を通じて内皮修復を促進する特有な重金属であることも示唆された。

前節において、bFGF による内皮修復の促進作用が鉛によって阻害されることが示されたので、内皮増殖に対する両者の相互作用を検討した。Fig. I-6 に示すよ

うに、bFGFは単独で内皮細胞による $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを促進したが、この作用は0.5および5 μM の鉛によって濃度依存的に有意に抑制された。

Table I -3

Effect of lead, zinc, copper, manganese and nickel on the incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular endothelial cells

	$[^3\text{H}]$ Thymidine (dpm/ μg DNA)
Control	4 440 \pm 130
Lead	1 530 \pm 115***
Zinc	11 822 \pm 1 387*
Copper	4 647 \pm 632
Manganese	3 935 \pm 600
Nickel	3 615 \pm 307

Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate, zinc sulfate, copper chloride, manganese chloride or nickel chloride at 10 μM each and labeled with $[^3\text{H}]$ thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of four samples. Significantly different from the control, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

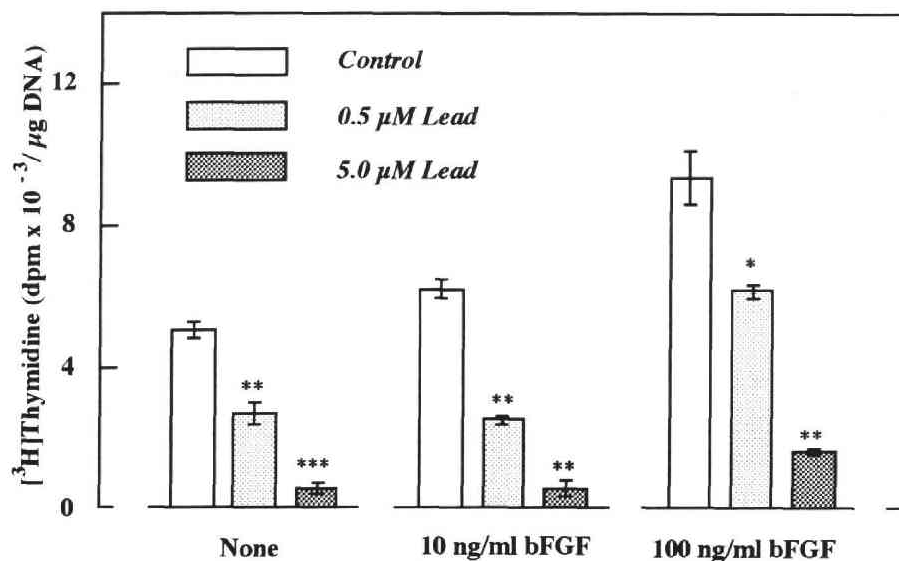


Fig. I -6. Interaction of lead with bFGF on the incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the acid-insoluble fraction of cultured vascular endothelial cells. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 0.5 or 5.0 μM combined with or without bFGF at 10 or 100 ng/ml and labeled with $[^3\text{H}]$ thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

第3節 鉛による血管平滑筋細胞増殖の促進

血管平滑筋細胞の血管内膜での増殖は、動脈硬化巣の形成過程における最も重要なものの一つである (Ross, 1993)。また、鉛曝露後のハトの動脈壁において、血管平滑筋細胞の過形成が観察されることが報告されている (Revis et al., 1981)。そこで、血管平滑筋細胞の増殖に対する鉛の作用を検討した。Fig. I-7 に示すように、血管平滑筋細胞による $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みは、 $0.5\ \mu\text{M}$ 以上の鉛によって濃度依存的に有意に増加した。従って、血管内皮細胞の増殖は鉛によって阻害されるが、血管平滑筋細胞の増殖は逆に促進されることが示唆された。

Table I-4 に、増殖期の血管平滑筋細胞に対する鉛の細胞毒性を細胞から培地に逸脱した LDH を指標として検討した結果を示す。増殖期の血管平滑筋細胞において、LDH の逸脱は $10\ \mu\text{M}$ の鉛によって有意な変化を示さず、この金属による細胞毒性は血管平滑筋細胞においても認められなかった。

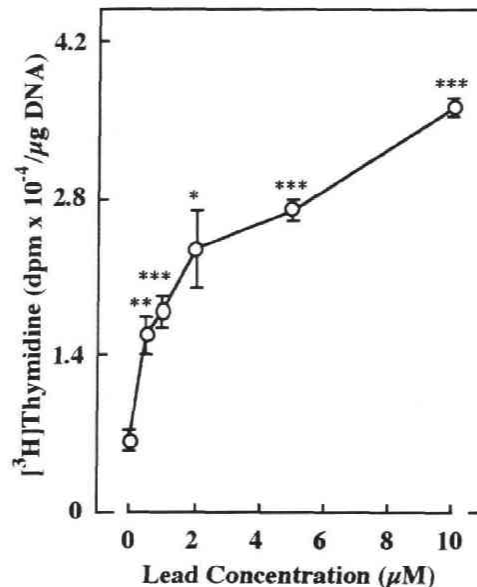


Fig. I-7. Effect of lead on the incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the acid-insoluble fraction of cultured vascular smooth muscle cells. Growing cultures of bovine aortic smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 or $10.0\ \mu\text{M}$ and labeled with $[^3\text{H}]$ thymidine during the last 6 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of four samples. Significantly different from the control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Table I -4

Effect of lead on the leakage of LDH into the medium from cultured vascular smooth muscle cells

Lead nitrate (μM)	LDH activity (IU/L)
Control	0.592 ± 0.048
0.5	0.576 ± 0.041
1.0	0.533 ± 0.038
2.0	0.563 ± 0.015
5.0	0.561 ± 0.031
10.0	0.546 ± 0.027

Growing cultures of bovine aortic smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 or 10.0 μM . Values are means \pm S.E. of four samples.

鉛が血管平滑筋細胞の増殖を促進することが示唆されたが、この促進が重金属に一般的な作用である可能性も考えられる。そこで、血管平滑筋細胞の増殖に対する亜鉛、銅、マンガンおよびニッケルの作用を ^3H チミジンの取り込みを指標として検討し、鉛の作用と比較した。Table I-5 に示すように、鉛 (10 μM) によって血管平滑筋細胞への ^3H チミジンの取り込みは有意に増加したが、同濃度の亜鉛、銅、マンガンおよびニッケルによる有意な変化は認められなかった。従って、本章第1節に示した内皮修復阻害作用のみならず、血管平滑筋細胞に対する増殖促進作用も他の重金属にはない鉛に特有な現象である可能性が考えられる。

ところで、血管内皮細胞層の破綻を契機として、内皮下組織への血小板の粘着・凝集やマクロファージの蓄積が起これ、これらの細胞から分泌される様々な増殖因子によって血管平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖が誘発される (Ross, 1993)。血管内膜における血管平滑筋細胞の増殖に関与する増殖因子のうち、PDGF (Ross et al., 1974)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF) および bFGF (Gospodarowicz et al., 1977) について鉛との相互作用を検討した。Table I-6 に示すように、血管平滑筋細胞への ^3H チミジンの取り込みは、PDGF、aFGF および bFGF の単独添加によっ

て有意に増加した。鉛は単独で ^3H チミジンの取り込みを増加させたが、PDGF および aFGF による促進作用を抑制した。また、鉛を bFGF と共存させた際には ^3H チミジン取り込みの相加的な増加が観察された。

Table I -5

Effect of lead, zinc, copper, manganese and nickel on the incorporation of ^3H thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular smooth muscle cells

	^3H Thymidine (dpm/ μg DNA)
Control	7 766 \pm 563
Lead	15 657 \pm 612**
Zinc	6 635 \pm 601
Copper	9 682 \pm 497
Manganese	8 136 \pm 1 023
Nickel	7 132 \pm 794

Growing cultures of bovine aortic smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate, zinc sulfate, copper chloride, manganese chloride or nickel chloride at 10 μM each and labeled with ^3H thymidine during the last 6 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of four samples. Significantly different from the control, ** $P < 0.01$.

Table I -6

Interaction of lead with PDGF, aFGF and bFGF on the incorporation of ^3H thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular smooth muscle cells

Lead nitrate (μM)	^3H Thymidine (dpm/ μg DNA)					
	PDGF		aFGF		bFGF	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Control	7 485 \pm 285	29 493 \pm 2 112	7 550 \pm 455	18 522 \pm 997	8 201 \pm 1 304	16 202 \pm 1 130
1.0	—	—	11 669 \pm 740	10 917 \pm 947	18 803 \pm 1 176	26 146 \pm 1 758
5.0	11 163 \pm 450	14 718 \pm 423	—	—	28 564 \pm 1 331	34 854 \pm 508

Growing cultures of bovine aortic smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 1.0 or 5.0 μM combined with or without PDGF at 75 ng/ml, aFGF at 10 ng/ml or bFGF at 1.0 ng/ml and labeled with ^3H thymidine during the last 6 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of four samples.

The stimulatory effect of lead in the absence of growth factors is significant, $P < 0.01$.

The effect of PDGF, aFGF and bFGF are each significant, $P < 0.01$.

The suppressive effect of lead in the presence of either PDGF or aFGF is significant, $P < 0.01$.

(-), Absence; (+), Presence; —, not determined.

鉛はカルモジュリン感受性のプロセスを活性化するなど、カルシウム様の作用を有する可能性が示されている (Goldstein and Ar, 1983)。このことから、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の鉛に対する応答性の違いが、細胞内カルシウムに対する応答性の違いに基づく可能性が考えられた。そこで、内皮細胞および血管平滑筋細胞の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みに対するカルシウムイオノフォア A23187 の作用を検討したところ、内皮細胞による $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みは、A23187 によって顕著に減少したのに対し、血管平滑筋細胞では取り込みの有意な増加が認められた (Fig. I-8)。

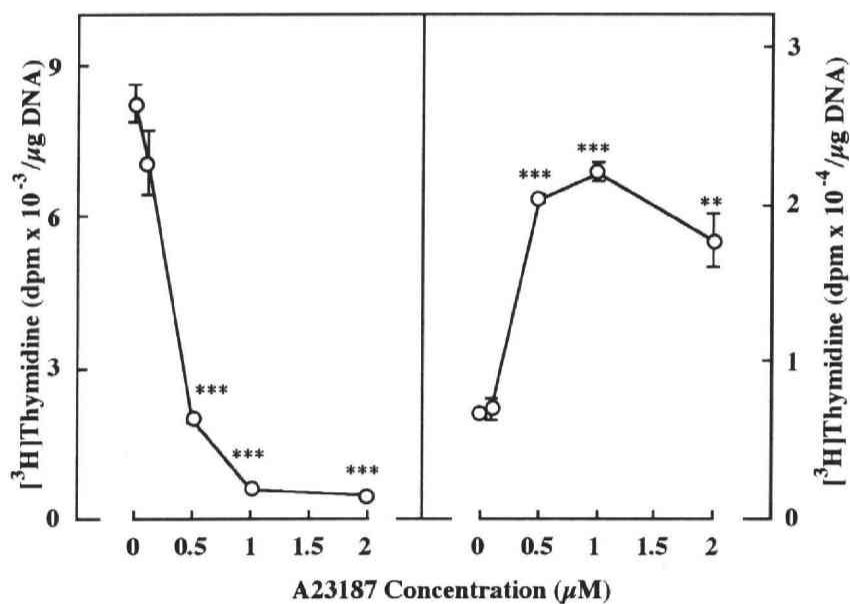


Fig. I-8. Effect of calcium ionophore A23187 on the incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the acid-insoluble fraction of cultured vascular endothelial cells (left panel), and vascular smooth muscle cells (right panel). Growing cultures of bovine aortic endothelial cells and smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of A23187 at 0.1, 0.5, 1.0 or 2.0 μM and labeled with $[^3\text{H}]$ thymidine during the last 3 h (endothelial cells) or 6 h (smooth muscle cells) of the incubation. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the control, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

第4節 考察

血管内皮細胞は、血管内腔を一層で覆っている細胞であり、血栓止血機序および血管病変発症機序に重要な役割を果たしている。内皮細胞が傷害された場合、傷害部位の速やかな修復が血管病変を防ぐうえで重要である。本章において、傷害された内皮細胞層の修復を鉛が阻害することが示された。すなわち、内皮細胞層の維持という観点から見たとき、鉛は細胞層を直接的に傷害するのではなく（Kaji et al., 1995）、傷害後あるいは細胞層のターンオーバーの過程で細胞層の再構築を阻害することが示唆された。従って、鉛は維持された内皮細胞層において、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPGs）の代謝異常（Kaji et al., 1991; Kaji et al., 1997）に起因する凝固促進性や組織型プラスミノゲンアクチベーターの選択的な分泌抑制による線溶活性の低下（Kaji et al., 1992a）を引き起こすだけでなく、内皮細胞層の傷害部位の修復阻害を通じて血管病変の発症と進展に関与し得ると考えられる。

血管内皮細胞層の修復は、内皮細胞の傷害部位への遊走とその部位での増殖によって行われる。本章に示した結果は、鉛による内皮修復の阻害が非特異的な細胞傷害によるものではなく、主として細胞増殖の阻害に起因することを示唆するものであった。今回、検討したカチオンの中では内皮修復阻害作用および内皮増殖阻害作用を有するのは鉛だけであった。すなわち、鉛は非特異的な細胞傷害を引き起こさずに内皮増殖を抑制して内皮修復を阻害する特有の金属であることが示唆された。ところで、鉛は単独では内皮細胞に対して強い細胞毒性を示さないが、カドミウムによる内皮細胞層の傷害を増強することが報告されている（Kaji et al., 1995）。その機序は明らかではないが、少なくともカドミウムの細胞内への蓄積の増加やメタロチオネインの誘導阻害によるカドミウムの細胞毒性の増強は否定されている（Kaji et al., 1995）。本章の結果から、カドミウムの細胞毒性によって傷害された内皮細胞層の修復過程を鉛が阻害することにより内皮細胞層が見かけ上より重篤に傷害される可能性が推察された。なお、カドミウムは鉛と同様に心血管病変を誘発

する危険因子とされている (Schroeder, 1965; Revis et al., 1981; Niwa and Suzuki, 1982) が、カドミウムは内皮細胞に対して強い細胞毒性を示し、その結果細胞層を強く傷害する (Kaji et al., 1992b) ので、内皮修復に対する作用は検討されていない。

血管内皮細胞は自己分泌型機能調節因子として bFGF を産生しているが、この増殖因子は内皮細胞の遊走・増殖とプロテアーゼ活性を促進することによって速やかな内皮修復に寄与しているとされる (Sato and Rifkin, 1988)。しかしながら、bFGF は分子中にシグナルを持たず、主として重篤に傷害された細胞内から逸脱して近傍の内皮細胞に作用し、遊走・増殖を含む機能を調節すると考えられている (Rifkin and Moscatelli, 1989)。本研究において、鉛は bFGF による内皮増殖促進作用を強く抑制し、その結果 bFGF による傷害内皮修復促進作用も強く阻害することが示された。従って、鉛は内皮細胞層の生理的な再構築を阻害するだけでなく、内皮細胞層が傷害されたとき死に至った内皮細胞から大量に bFGF が放出された場合においても bFGF に依存した内皮修復を阻害し、正常な内皮細胞層の維持を妨げるものと考えられる。また、本研究で認められた内皮修復および内皮増殖に対する鉛と bFGF との相互作用は、鉛による阻害作用が内因性の bFGF 活性の低下による可能性を示唆している。

一方、必須微量元素である亜鉛は、傷害された内皮細胞層の修復と [^3H]チミジンの取り込みを促進することが示された。この結果は、亜鉛が血管内皮細胞増殖の刺激を通じて傷害内皮細胞層の修復を促進する重金属であることを示唆している。これまで、骨組織における亜鉛の生理的役割については詳細な検討がされてきた (Yamaguchi et al., 1988; Yamaguchi and Hashizume, 1994) のに対して、内皮細胞に対する亜鉛の生理作用に関してはほとんど有用な知見は得られていない。そこで、第Ⅲ章において、傷害後内皮の修復および内皮細胞増殖に対する亜鉛の作用について詳しく検討した。

内皮細胞の増殖は、結果として血管内腔の抗血栓性を上昇させ、正常な内皮機

能の発現に基づく血液と血管組織の恒常性維持に重要であるのに対し、血管平滑筋細胞の増殖は動脈硬化巣の形成などむしろ血管の病理的变化に寄与する (Ross, 1993)。正常な血管組織において、血管平滑筋細胞は中膜に静止期の状態で存在する。本章において、鉛は血管平滑筋細胞の増殖に対しては促進的に作用することが示唆された。すなわち、細胞増殖を指標としたとき、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞は鉛に対して全く逆の応答を示し、鉛が細胞種に依存した様式で毒性を発現することになる。ところで、血管内膜における血管平滑筋細胞の増殖に関して、PDGF、aFGF および bFGF は代表的な細胞増殖因子であるとされる (Ross, 1993)。また、血管平滑筋細胞をトロンビンで刺激したとき PDGF (Kanthou et al., 1992) や bFGF (Weiss and Maduri, 1993) の発現が誘導されることから、これらの増殖因子は血管内皮が傷害され血液が凝固促進性になったときに血管平滑筋細胞に対する活性を発現すると推察される。本章において、鉛は単独で血管平滑筋細胞の増殖を刺激するが、PDGF および aFGF が共存した場合はそれらの増殖因子による血管平滑筋細胞の増殖促進活性を抑制すること、および bFGF と鉛の共存下では血管平滑筋細胞の増殖は相加的に促進されることが示唆された。これらの結果から、鉛による血管平滑筋細胞の増殖促進が少なくとも PDGF、aFGF および bFGF に依存しないこと、換言すれば鉛が直接的に血管平滑筋細胞の増殖を促進させることが推察された。

PDGF による血管平滑筋細胞の増殖促進には、細胞質のフリーカルシウム濃度の上昇が必要であること (Roe et al., 1989) が報告されている。実際、血管平滑筋細胞において、カルシウムイオノフォアが protooncogene の発現を促進することが示されている (Pukac et al., 1992)。一方、in vitro において、カルシウムチャンネルアンタゴニストの添加 (Watts et al., 1995) や反応溶液中からのカルシウムの除去 (Tomera and Harakal, 1986) によって、鉛による血管平滑筋細胞の収縮応答が抑制されること、しかも鉛が細胞内カルシウム濃度を上昇させること (Schanne et al., 1992) が報告されている。一方、鉛はカルモジュリン感受性のプロセスを活性

化するなどカルシウム様の作用を示すことも報告されている (Goldstein and Ar, 1983; Habermann et al., 1983)。従って、鉛がカルシウム依存的な経路を介して内皮細胞に対してはその増殖を阻害し、血管平滑筋細胞に対してはその増殖を刺激する可能性が考えられる。本章において、カルシウムイオノフォアである A23187 が内皮細胞では $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを減少させるのに対し、血管平滑筋細胞では増加させることが示された。この結果は、この2つの細胞種の増殖応答が細胞内カルシウムの増加によって全く逆の調節を受けることを示唆している。また、A23187 が鉛と同様に内皮細胞増殖を阻害し血管平滑筋細胞増殖を促進させたことは、鉛が細胞内カルシウム依存性の経路を介して内皮細胞および血管平滑筋細胞の増殖に対して毒性を発現するという仮説に矛盾しない。カルシウム依存性の経路が鉛によって活性化される機序として (i) 鉛が細胞内カルシウムイオンを増加させる、(ii) 細胞内に蓄積した鉛が疑似カルシウムとして働く、および (iii) 鉛が細胞内カルシウム代謝を攪乱する、などの可能性が考えられるが、詳細は不明である。

以上のように、鉛が血管内皮細胞の増殖を阻害することによって傷害内皮の修復および生理的な血管内皮の再構築を妨げるとともに、血管平滑筋細胞の増殖に対しては直接的な促進作用を示すことが示唆された。これらの作用は他の重金属には認められない鉛に特有のものである可能性が示された。本章で示された内皮細胞および血管平滑筋細胞の増殖に対する鉛の作用は、それが誘発する動脈硬化などの血管病変の機構を理解するうえで重要であると考えられる。

第Ⅱ章 鉛による内皮増殖の阻害機序

プロテオグリカンとは、コア蛋白と呼ばれる蛋白骨格にグリコサミノグリカン糖鎖を共有結合した分子群であり (Hook et al., 1984)、結合しているグリコサミノグリカンの種類によってヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) およびコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸プロテオグリカン (CS/DS PGs) に分類される。プロテオグリカンは、ほとんど全ての動物組織において細胞膜および細胞外マトリックスの構成成分として普遍的に存在し、微小環境の構築やグリコサミノグリカンおよびコア蛋白と細胞増殖因子・サイトカインなどの機能蛋白との相互作用を通じて細胞機能の調節に関与している (Ruoslahti and Yamaguchi, 1991)。血管内皮細胞層は、その表面に 40 ~ 50 μm の厚みを持ったグリコカリックス (Haldenby et al., 1994) とよばれる層を保持しているが、その主成分は主として HSPGs である (Marcum et al., 1986)。HSPGs の生物活性の多くは、ヘパラン硫酸糖鎖と機能蛋白との相互作用による。ヘパラン硫酸はヘパリン様配列を含む基本骨格を有し (Nader et al., 1987)、アンチトロニン III (Shimada et al., 1985) および Tissue factor pathway inhibitor (Novotny et al., 1991) との相互作用による血管内腔の抗血栓特性に寄与している。

ヘパラン硫酸は、内皮細胞および血管平滑筋細胞の増殖を含む機能調節にも関与している。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は血管内皮細胞における重要な自己分泌型の機能調節因子である (Sato and Rifkin, 1988) が、そのレセプターへの結合はヘパラン硫酸によって強く加速される (Yayon et al., 1991; Rapraeger et al., 1991; Ornitz et al., 1992)。しかも、ヘパラン硫酸に結合した bFGF は、プロテアーゼに対して抵抗性となり (Saksela et al., 1988)、活性発現が持続的になる (Flaumenhaft et al., 1989)。また、HSPGs は bFGF の oligomerization を誘導し、FGF レセプターの 2 量体化とそれに続くシグナル伝達を促進する (Spivak-Kroizman

et al., 1994)。一方、血管平滑筋細胞の増殖亢進は動脈硬化の初期病変の一つであるが、内皮細胞が産生するヘパラン硫酸はこの増殖に対する抑制能を有し (Castellot et al., 1982)、血管内膜における血管平滑筋細胞の増殖を阻害することで動脈硬化進展の防御に寄与していると考えられている。

前章において、鉛が血管内皮細胞の増殖を強く抑制することにより、傷害内皮細胞層の修復を阻害することを明らかにし、さらに、その過程で、この金属が内皮細胞の bFGF に対する応答性を低下させることを見い出した。bFGF の応答性が鉛によって阻害される機序として、bFGF の産生阻害、bFGF の FGF レセプターまたはヘパラン硫酸糖鎖への結合阻害、HSPGs の量的・質的变化および FGF レセプターの産生阻害などの可能性が考えられる。そこで、bFGF に対する内皮細胞の応答性低下の観点から、鉛の内皮増殖阻害機序を検討した。

第1節 bFGF の活性発現に対する鉛の作用

Fig. II-1 に、内皮増殖に対する鉛と抗 bFGF 中和抗体との相互作用を示す。鉛は単独で血管内皮細胞による $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを有意に減少させた。抗 bFGF 中和抗体で内因性 bFGF をブロックすることによっても内皮細胞の増殖は抑制されたが、この抑制作用は鉛によって増強されなかった。次に、鉛で前処理した内皮細胞の bFGF に対する増殖応答を検討した。Fig. II-2 に示すように、0.5 μM 以上の鉛で 12 時間前処理した内皮細胞において、bFGF による $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの促進は有意に抑制された。これらの結果は、鉛による内皮細胞増殖の阻害が内因性 bFGF の増殖促進作用に依存していること、また鉛に曝露した内皮細胞では bFGF に対する応答性の低下が起こっていることを示唆している。

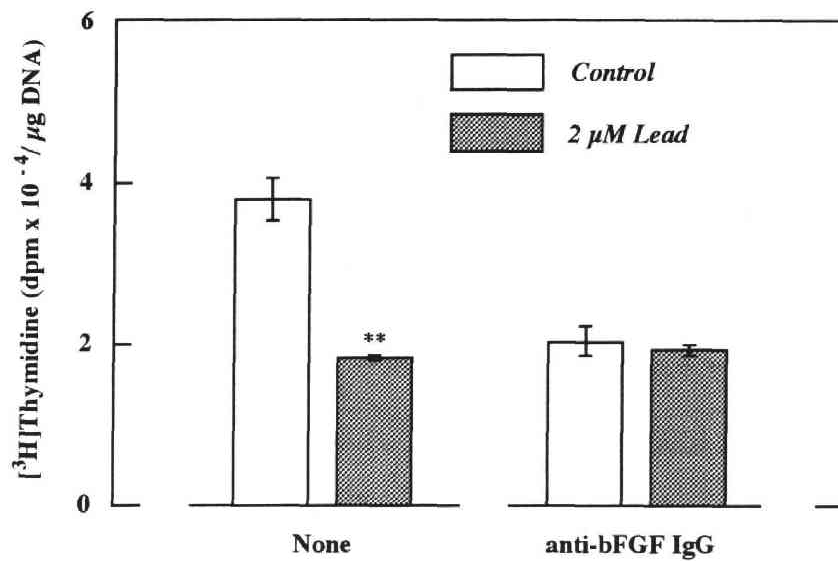


Fig. II-1. Effect of lead on the incorporation of [³H]thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular endothelial cells in the presence or absence of anti-bFGF IgG. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 2 μM combined with or without anti-bFGF IgG at 40 μg/ml and labeled with [³H]thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, ***P*<0.01.

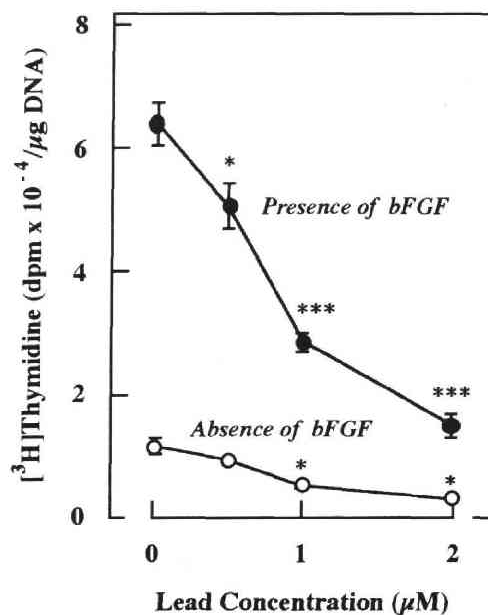


Fig. II-2. Effect of pretreatment with lead on the incorporation of [³H]thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular endothelial cells stimulated by exogenous bFGF. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were pretreated at 37°C for 12 h with lead nitrate at 0.5, 1 or 2 μM. They were then challenged at 37°C for 12 h with bFGF at 100 ng/ml in the absence of lead and labeled with [³H]thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, **P*<0.05; ****P*<0.001.

Fig. II-3 に、鉛で処理した内皮細胞層における内因性 bFGF の分布を示す。細胞内画分および FGF レセプター画分に結合している bFGF 量は、鉛による有意な影響を受けなかったが、HSPG 画分への bFGF の蓄積は、鉛の濃度依存的に有意に減少した。なお、各画分の bFGF 量を合計して求めた総 bFGF 量には鉛処理による有意な変化は認められなかった。従って、鉛による bFGF に対する応答性の低下は、bFGF および FGF レセプターの産生よりもヘパラン硫酸の減少または bFGF のヘパラン硫酸への結合阻害に起因することが推察される。

鉛がヘパラン硫酸に結合した内因性 bFGF を減少させることが示されたが、その原因として、鉛が直接的に bFGF のヘパラン硫酸への結合を阻害した可能性および鉛が内皮細胞層のヘパラン硫酸を減少させた可能性が考えられる。Fig. II-4 に、 $[^{125}\text{I}]$ bFGF の HSPGs および FGF レセプターへの結合に対する鉛の作用を示す。 $[^{125}\text{I}]$ bFGF の FGF レセプターへの結合は鉛の影響を受けなかったが、HSPG 画分への結合は、5 μM の鉛によって有意に減少した。従って、鉛が bFGF の HSPGs への結合を直接的に阻害する可能性も考えられるが、そのような阻害が起こる鉛の濃度は、内皮細胞増殖が阻害される濃度 ($\sim 2 \mu\text{M}$) よりも高かった。

ところで、FGF レセプターは発現しているが HSPGs を発現していない細胞において、bFGF のレセプターへの結合とその増殖促進活性がヘパリン、ヘパラン硫酸あるいはヘパリン断片を添加することで回復することが報告されている (Yayon et al., 1991; Rapraeger et al., 1991; Ornitz et al., 1992; Aviezer et al., 1994b)。そこで、内皮増殖に対する鉛とヘパリンの相互作用について検討したところ、Fig. II-5 に示すように、鉛 (1 μM) による内皮細胞への $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの減少は、ヘパリンによって完全に回復した。この結果から、鉛による内皮増殖の阻害作用は、bFGF の HSPGs への結合阻害によるのではなく、内皮細胞層中のヘパラン硫酸糖鎖の減少に起因するものと考えられる。

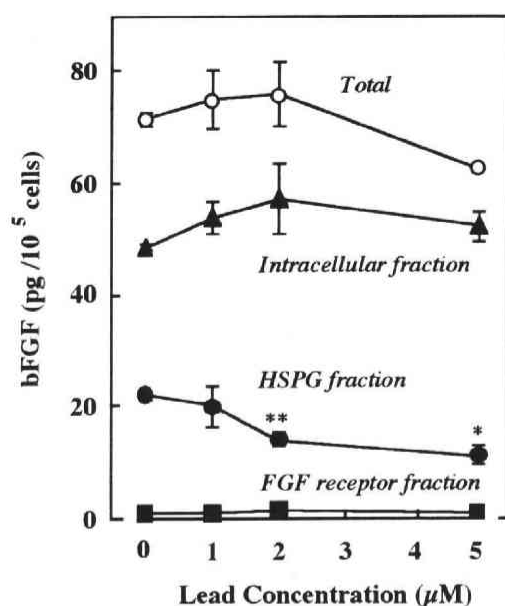


Fig. II-3. Compartmentalization of bFGF in growing vascular endothelial cell layer after exposure to lead. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 48 h with lead nitrate at 1, 2 or 5 μM. O, The total bFGF content calculated by an addition of the bFGF content accumulated in every fraction; ■, bFGF bound to the high affinity FGF receptor fraction; ●, bFGF bound to the low affinity HSPG fraction; ▲, bFGF accumulated in the intracellular fraction. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

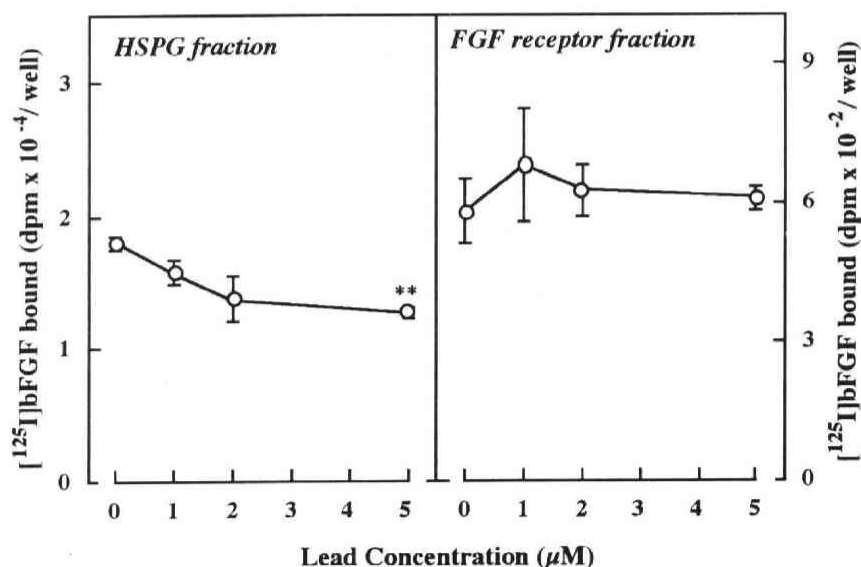


Fig. II-4. Effect of lead on the binding of [¹²⁵I]bFGF to the low affinity HSPG fraction and the high affinity FGF receptor fraction. Subconfluent cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 4°C for 3 h in the binding medium containing [¹²⁵I]bFGF in the presence of lead nitrate at 1, 2 or 5 μM. Nonspecific binding was measured in the presence of cold bFGF at 1 μg/ml and the specific binding was calculated by subtracting the nonspecific binding from the total binding. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, ** $P < 0.01$.

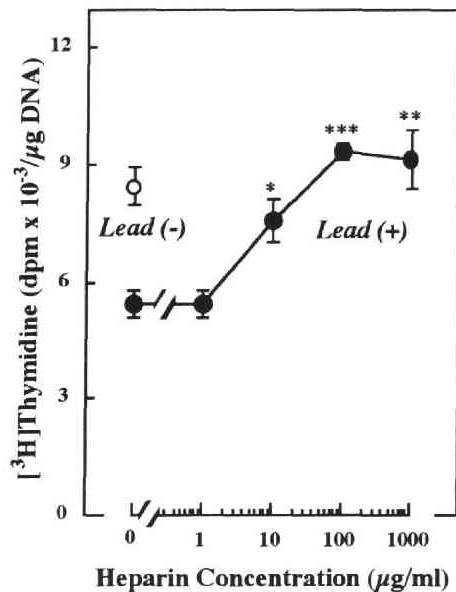


Fig. II-5. Effect of heparin on lead-induced decrease in the incorporation of [³H]thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular endothelial cells. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 48 h in the presence of lead nitrate at 1 μM combined with or without heparin at 1, 10, 100 or 1000 μg/ml and labeled with [³H]thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of four samples. Open circle indicates cultures treated without lead and heparin. Significantly different from the control (treated with lead alone), **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

第2節 鉛による HSPGs の変化

前節において、鉛による内皮増殖の障害がヘパラン硫酸の減少に起因する可能性が示唆された。そこで、増殖期の内皮細胞によるグリコサミノグリカンの産生に対する鉛の作用について検討した。Fig. II-6 に内皮細胞グリコサミノグリカンへの [³H]グルコサミンおよび [³⁵S]硫酸の取り込みに対する鉛の作用を示す。グリコサミノグリカン合成の指標である [³H]グルコサミンおよび [³⁵S]硫酸の取り込みは、鉛によって細胞表層と培地の両方において濃度依存的に有意に減少した。この結果は、鉛が増殖期の内皮細胞によるグリコサミノグリカンの産生を抑制することを示している。

ところで、HSPGs は異なる遺伝子産物であるコア蛋白によって分子種が決定されるが、結合するコア蛋白が異なればヘパラン硫酸糖鎖の機能も異なることが明ら

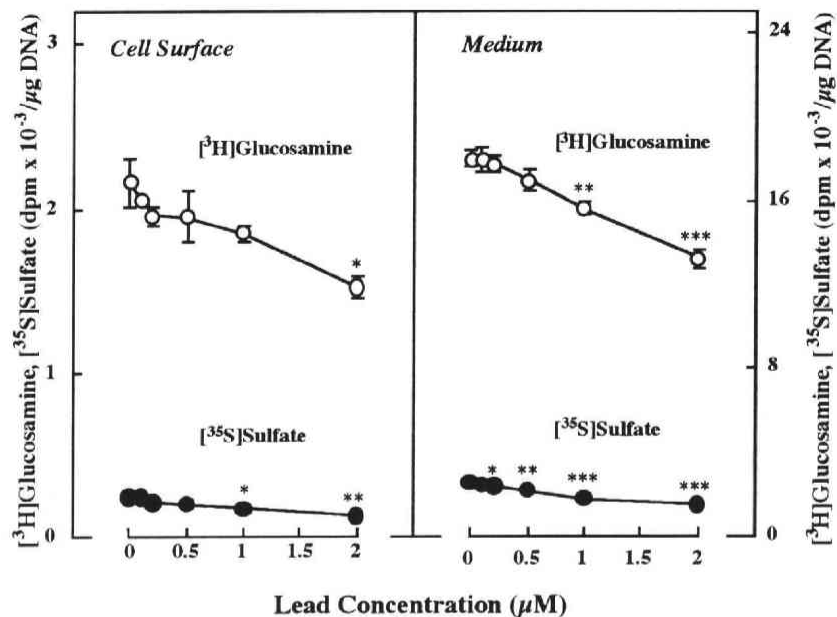


Fig. II-6. Effect of lead on the incorporation of [³H]glucosamine and [³⁵S]sulfate into glycosaminoglycans accumulated in the cell surface (left panel) and the conditioned medium (right panel) of growing vascular endothelial cells. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 48 h in the presence of lead nitrate at 0.1, 0.2, 0.5, 1 or 2 μM. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

かにされている (Bernfield et al., 1993)。血管内皮細胞が産生する HSPGs には、2つのサブクラスが存在する。基底膜の構成成分である大型のパールカン (Iozzo et al., 1994) を含む高分子量型サブクラスと細胞膜に結合して存在しているグリピカン、シンデカン、フィブログリカン (Mertens et al., 1992) およびリユドカン (Kojima et al., 1992) の4種の小型 HSPG 分子種を含む低分子量型サブクラスである。このうち、bFGF のレセプターへの結合を促進するのはパールカンに結合したヘパラン硫酸糖鎖のみであり (Aviezer et al., 1994a)、その他の小型の HSPGs に結合したヘパラン硫酸糖鎖はこのような活性を示さず、むしろパールカンに対して拮抗的に働く (Aviezer et al., 1994b)。従って、ヘパラン硫酸の量的変化による内皮機能の修飾を知るためには、プロテオグリカンレベルでの変化、すなわち各サブクラスが保持するヘパラン硫酸量、ヘパラン硫酸鎖の長さおよびコア蛋白量の変化が解析されなければならない。

Fig. II-7 に、増殖期の内皮細胞層および培地画分に蓄積した放射活性標識プロテオグリカン（PG）を非会合条件下で抽出し、ジエチルアミノエチル（DEAE）-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果を示す。細胞層および培地の両画分において、2つの ^{35}S 硫酸のピークが認められた。本条件下においては、約 0.4 M の NaCl で溶出されるピークには HSPGs が、約 0.5 M の NaCl で溶出されるそれには CS/DS PGs が含まれる（Kinsella and Wight, 1986）。細胞層および培地の両画分において、全てのピークが鉛によって減少したが、その減少は特に HSPG 画分において顕著であった。従って、鉛が増殖期の内皮細胞におけるヘパラン硫酸の産生を特に強く阻害し、その結果細胞層のヘパラン硫酸量を顕著に減少させるものと考えられる。

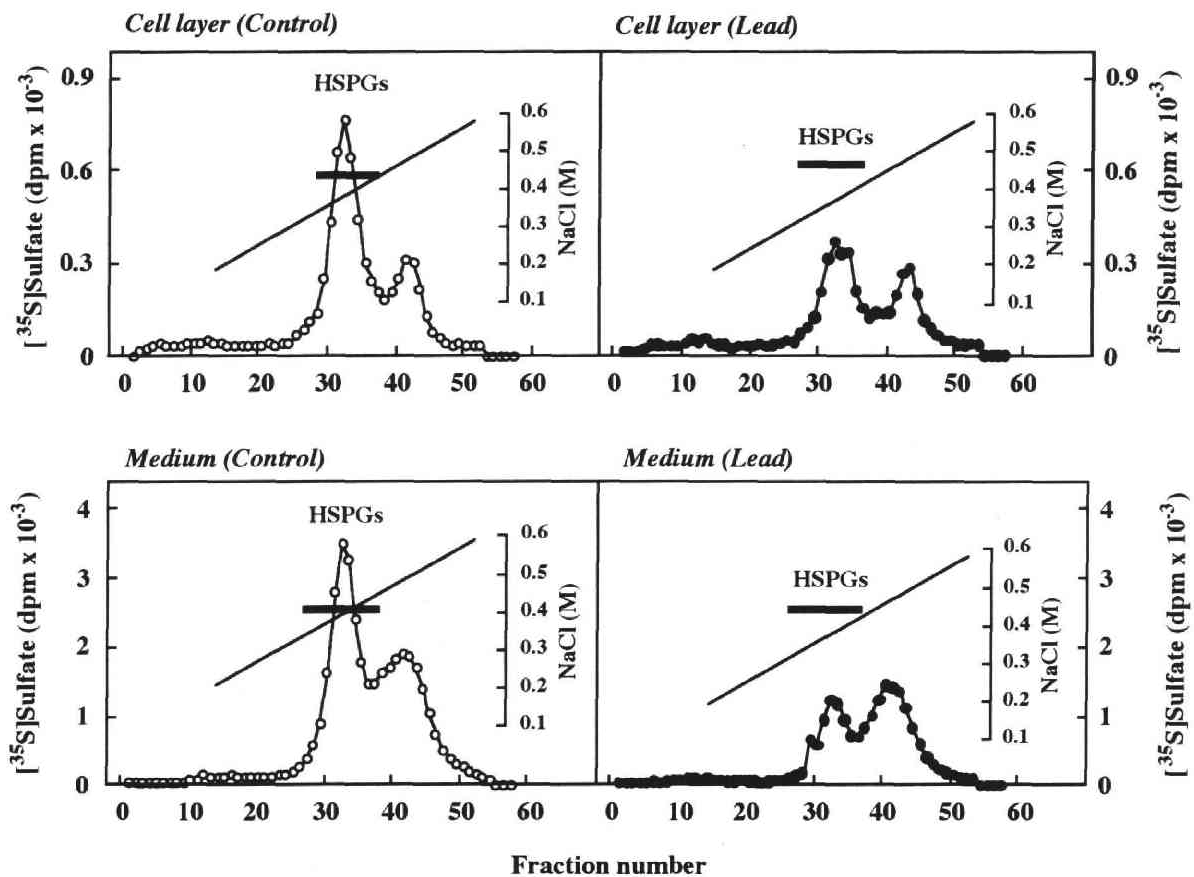


Fig. II-7. DEAE-Sephacel chromatography of ^{35}S sulfate-labeled macromolecules obtained from vascular endothelial cell layer (upper panels) and the conditioned medium (lower panels). Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 48 h with (right panels) or without (left panels) lead nitrate at 2 μM in the presence of ^{35}S sulfate.

Fig. II-8 に、コンドロイチン ABC リアーゼ消化によって得た細胞層画分および培地画分の HSPGs を Sepharose CL-4B を用いてゲルろ過し、分子量に基づく分離を行った結果を示す。細胞層画分および培地画分の HSPGs は、それぞれ高分子量型と低分子量型の2つのサブクラスに分離された。このうち、高分子量型サブクラスは主としてパルカン、低分子量型サブクラスは主として HSPGs の分解産物を含んでいる。鉛は両方のサブクラスへの $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みを減少させたが、高分子量型サブクラスにおいてより顕著な減少が観察された。

Fig. II-9 に、コンドロイチン ABC リアーゼ消化によって得た細胞層および培地画分の HSPGs をパパインまたはヘパリチナーゼで消化後、Sepharose CL-6B でゲルろ過し、ヘパラン硫酸糖鎖の特性を検討した結果を示す。酵素処理をしなかった場合、対照の細胞層および培地の両画分において、Void volume (V_0) 付近に $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の高い放射活性が認められた。このピークがヘパリチナーゼ処理によって Total volume (V_t) 付近に完全にシフトしたことから、このグリコサミノグリカン糖鎖がヘパラン硫酸糖鎖であることが確認された。パパイン処理によりプロテオグリカン

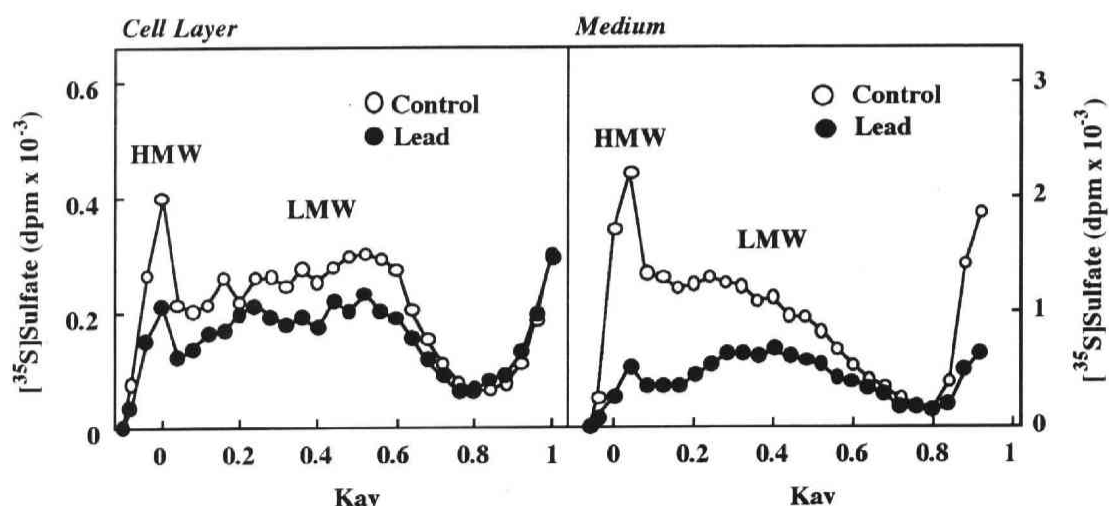


Fig. II-8. Sepharose CL-4B gel chromatography of $[^{35}\text{S}]$ sulfate-labeled HSPGs obtained from the cell layer (left panel) and the conditioned medium (right panel) of growing vascular endothelial cells treated with (●) or without (○) lead nitrate at $2\ \mu\text{M}$ for 48 h. HMW, high molecular weight subclass; LMW, low molecular weight subclass.

のコア蛋白を分解した場合、Kav 値 0.32 にピークが認められた。これらの結果は、増殖期の内皮細胞が産生する HSPGs が平均分子量約 50 kDa のヘパラン硫酸糖鎖を有することを示している。この特性は、鉛で処理した内皮細胞においても同様に認められた。従って、鉛による内皮細胞層および培地のヘパラン硫酸量の減少はヘパラン硫酸糖鎖の短縮に起因せず、コア蛋白当たりのヘパラン硫酸糖鎖数の減少あるいはコア蛋白合成の阻害による HSPG 分子数の減少に起因することが示唆された。

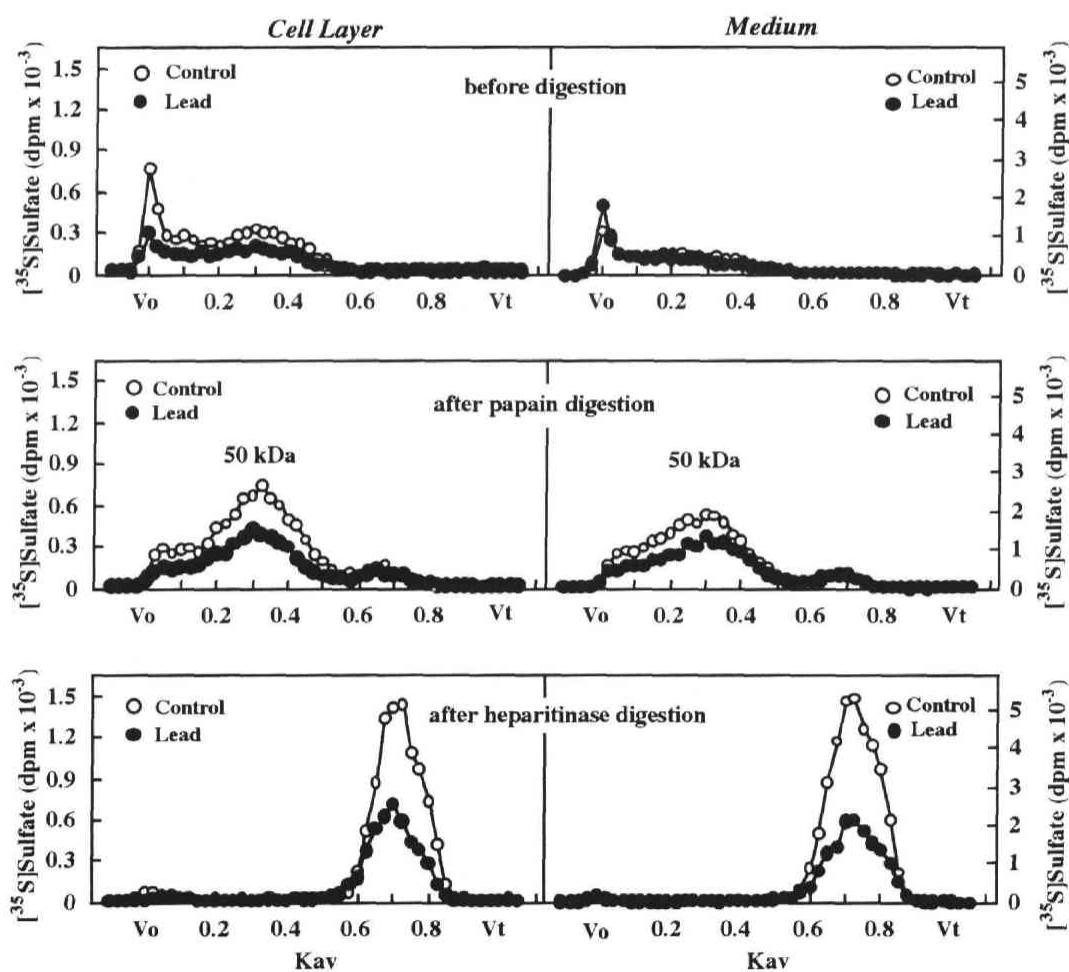


Fig. II-9. Sepharose CL-6B gel chromatography of [^{35}S]sulfate-labeled HSPGs before and after digestion with papain or heparitinase obtained from the cell layer (left panels) and the conditioned medium (right panels) of growing vascular endothelial cells treated with (●) or without (○) lead nitrate at 2 μM for 48 h.

Fig. II-10 に、 $[^{35}\text{S}]$ アミノ酸で標識したプロテオグリカンのコア蛋白をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分析した結果を示す。ヘパリチナーゼ処理によって出現するバンドが HSPG コア蛋白である。細胞層および培地画分において、HSPG コアが分子量約 400 kDa の位置に認められた。この大型のコア蛋白は、ウエスタンブロット分析によってパールカンコアであることが確認された。細胞層および培地の両画分において、パールカンコアは鉛によって顕著に減少した。この結果は、鉛がパールカンコア蛋白の合成を阻害することによって、細胞層および培地に蓄積したパールカン分子数を減少させる可能性を示している。従って、増殖期の内皮細胞において、鉛によるヘパラン硫酸糖鎖の産生減少は、ヘパラン硫酸糖鎖の短縮ではなくパールカンコア蛋白の合成の強い阻害に起因することが示された。なお、本条件においては低分子量型 HSPG コアは検出できなかった。

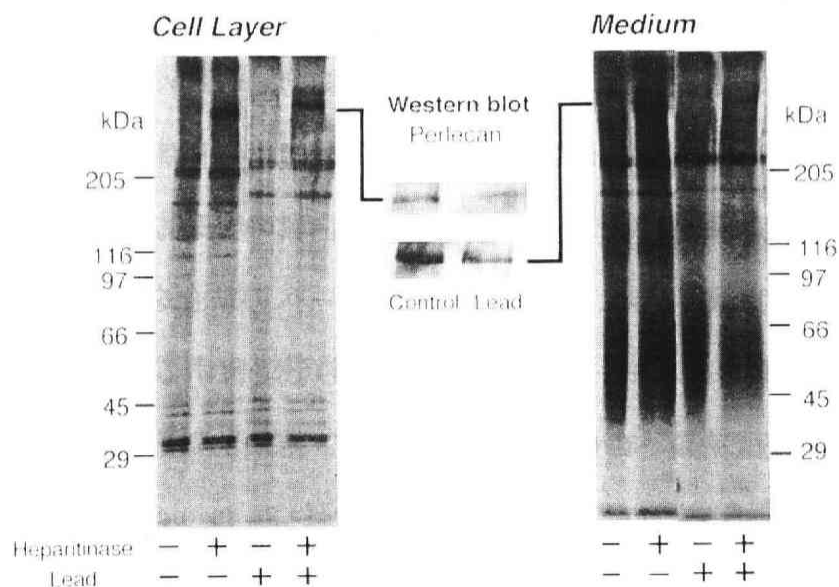


Fig. II-10. Core protein analysis of HSPGs from the cell layer (left panel) and the conditioned medium (right panel) of growing vascular endothelial cells treated with or without lead nitrate at 2 μM for 48 h in the presence of $[^{35}\text{S}]$ amino acids. Radiolabeled proteoglycans digested with or without heparitinase were analyzed by SDS-PAGE with a 4-12% gradient gel under a reducing condition. Separately, cold perlecan core was prepared in a similar way and identified by Western blot analysis.

第3節 考察

bFGF は、細胞内にチロシンキナーゼ領域を持つ FGF レセプターと結合することによってその活性を発現する (Givol and Yayon, 1992; Johnson and Williams, 1993; Jaye et al., 1992) が、bFGF の活性が持続的かつ十分に発現されるためには、bFGF のヘパラン硫酸糖鎖への結合が必須である (Rapraeger et al., 1991; Ornitz et al., 1992; Flaumenhaft et al., 1989; Spinvak-Kroizman et al., 1994)。本章において、鉛が内皮細胞の bFGF に対する応答性を低下させる変化を引き起こし、内因性 bFGF の活性発現が低下した結果、増殖が阻害される可能性が示唆された。鉛に曝露した内皮細胞において、内因性 bFGF の蓄積は細胞内画分および FGF レセプター画分では変化せず、HSPG 画分中の bFGF のみが減少したことから、鉛が bFGF の HSPGs への結合を直接的に阻害する可能性も考えられるが、鉛が内皮細胞の増殖を阻害 ($[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの減少) する濃度は bFGF の HSPGs への結合を直接的に阻害する濃度よりも低いことから、この現象における直接的な結合阻害の関与は実際には小さいものと思われる。そこで、内皮細胞層のヘパラン硫酸量に対する鉛の影響を検討したところ、鉛によるヘパラン硫酸産生の阻害が認められ、この現象が増殖期の内皮細胞におけるパールカンコア蛋白質の顕著な合成阻害に起因することが示された。従って、鉛は bFGF のレセプターへの結合を促進する唯一のプロテオグリカン分子種であるパールカン分子の産生を阻害することにより、内因性 bFGF のヘパラン硫酸糖鎖への結合量を減少させ、結果的に内皮細胞の bFGF に対する応答性を低下させるものと考えられる。

著者の所属する研究室では、静止期の内皮細胞では鉛が大型 HSPG 分子種パールカンの産生過程においてコア蛋白の合成には影響を及ぼさず、この蛋白当たりのヘパラン硫酸糖鎖数を減少させる結果 (Kaji et al., 1997)、内皮細胞のヘパラン硫酸量を減少させることを見いだしている (Kaji et al., 1991)。しかしながら、内皮

細胞が遊走・増殖するとき (Kinsella and Wight, 1986; Kinsella et al., 1997) および内皮細胞のフェノタイプが変化するとき (Järveläinen et al., 1992; Oohira et al., 1983) には、静止期とは異なるプロテオグリカン合成の調節が認められている。本章において、鉛による増殖期の内皮細胞プロテオグリカンの特徴的な変化が、ヘパラン硫酸糖鎖の短縮およびコア蛋白当たりのこの糖鎖数の減少ではなく、パールカンコア蛋白の合成阻害によるパールカン分子数の減少であり、その結果として内皮細胞によるヘパラン硫酸糖鎖の産生を減少させることが示された。このことから、鉛は内皮細胞に作用してヘパラン硫酸の産生を阻害するが、そのメカニズムは増殖期の内皮細胞と静止期の内皮細胞間で異なるものと考えられる。

血管内皮細胞が産生する全ての HSPG 分子種のヘパラン硫酸糖鎖は、ヘパリン様活性を発現することが知られているが、パールカンおよび細胞膜結合型小型 HSPG 分子種グリピカンはアンチトロンビン III に対する親和性が高く、内皮細胞によるエンドサイトーシスを受けずに液相中に放出され、血管内皮細胞表面の固相および局所的な液相の両方において抗血栓性に対して重要な役割を果たしている (Mertens et al., 1992)。鉛がグリピカンに結合したヘパラン硫酸を減少させるかどうかは明らかにできなかったが、鉛によるヘパラン硫酸の減少が主要産物であるパールカンにおいて確認されたことは、この金属が増殖期の内皮細胞表層の抗凝固活性も低下させることを示唆している。一方、bFGF は内皮細胞の遊走・増殖を刺激することによって傷害内皮の修復に寄与する (Sato and Rifkin, 1988) だけでなく、内皮細胞からのプラスミノゲンアクチベーターおよびそのインヒビターの分泌を制御して (Yamamoto et al., 1994; Kaji et al., 1994a) 血液線溶系の調節にも重要な役割を果たしている。従って、鉛は内皮細胞層のヘパラン硫酸を減少させることによって血管内腔の抗凝固特性を低下させるだけでなく、内皮細胞の bFGF に対する応答性を減少させることによって線溶調節と内皮修復を含む bFGF による内皮機能の調節を傷害することが推察される。鉛によるパールカン分子の減少は、内皮

細胞層表面の抗凝固活性を低下させるだけでなく血管内皮傷害部位を凝固促進性に傾け、動脈硬化を含む血管病変の発症と進展に関与する可能性も考えられる。血管内皮細胞パールカン合成の調節を介在する細胞内情報伝達経路は不明であるが、前章において鉛の内皮細胞増殖阻害作用が細胞内カルシウム依存的な経路を介している可能性が示されたことから、鉛が細胞内カルシウム依存的な経路を介してパールカン合成を阻害する可能性も考えられるが、その詳細は不明である。本章で示された血管内皮細胞の細胞外マトリックス調節に対する鉛の毒性発現は、この重金属による血管組織の傷害機序を理解するうえで重要であると考えられる。

第Ⅲ章 内皮修復に対する鉛と亜鉛の相互作用

亜鉛は多くの生物において重要な生理的な役割を果たしているため、必須性の重金属であるとされているが、血清亜鉛濃度の低下と血管病変は相関することが疫学的に示されている (Kok et al., 1988)。実際、アルブミン透過能を指標としたとき、亜鉛欠乏が培養血管内皮細胞の障壁としての機能を著しく低下させることが報告されている (Henning et al., 1992)。また、亜鉛は抗酸化的機能と膜安定化によって不飽和脂肪酸やサイトカインによる血管内皮細胞の傷害を防御し、結果として動脈硬化病変の発症に対する防御因子として機能すると考えられている (Wilkins and Leake, 1994)。しかしながら、内皮細胞の機能調節における亜鉛の役割はほとんど解明されていない。

ところで、亜鉛はカドミウムの毒性を防御する金属元素として古くから研究されてきた (Probst et al., 1977; Stacey and Klaassen, 1981; Webb, 1972; Kaji et al., 1988; Ochi et al., 1988)。著者の所属する研究室では血管内皮細胞の細胞培養系を用いてこれを研究し、亜鉛がカドミウムの細胞内への蓄積を減少させ、結果的にカドミウムの細胞毒性による内皮細胞層の傷害を防御することを明らかにしている (Kaji et al., 1992c; Kaji et al., 1993)。一方、鉛と亜鉛の相互作用についての報告は少ないが、個体レベルでの鉛の毒性が亜鉛によって軽減されることが報告されている (Finelli et al., 1975; Petering, 1978)。従って、増殖阻害に基づく傷害内皮の修復阻害という血管内皮細胞に対する鉛の毒性発現も亜鉛によって軽減される可能性が考えられる。また、亜鉛の生理的な役割が鉛によって阻害される可能性も否定できない。

第Ⅰ章において、亜鉛が傷害内皮細胞層の修復を促進することが示唆された。すなわち、内皮修復に対して亜鉛は鉛と相反する作用を有することが示唆された。そこで、本章では、内皮修復に対する亜鉛の作用を詳しく調べ、さらに内皮修復に対する亜鉛と鉛の相互作用について検討した。

第1節 亜鉛による内皮修復の促進とその特性

傷害された内皮細胞層の修復に対する亜鉛の効果を検討したところ、Fig. III-1に示すように基線を越えて傷害部位に現れた細胞数の亜鉛による濃度依存的な増加が形態学的な観察により明らかにされた。そこで、傷害部位に現れた内皮細胞数を計測したところ、5 μM 以上の亜鉛による細胞数の有意な増加が認められ、形態学的観察の結果と一致した。これらの結果は、鉛が内皮修復を阻害するのとは対照的に、亜鉛は内皮修復を促進する重金属であることを示している。

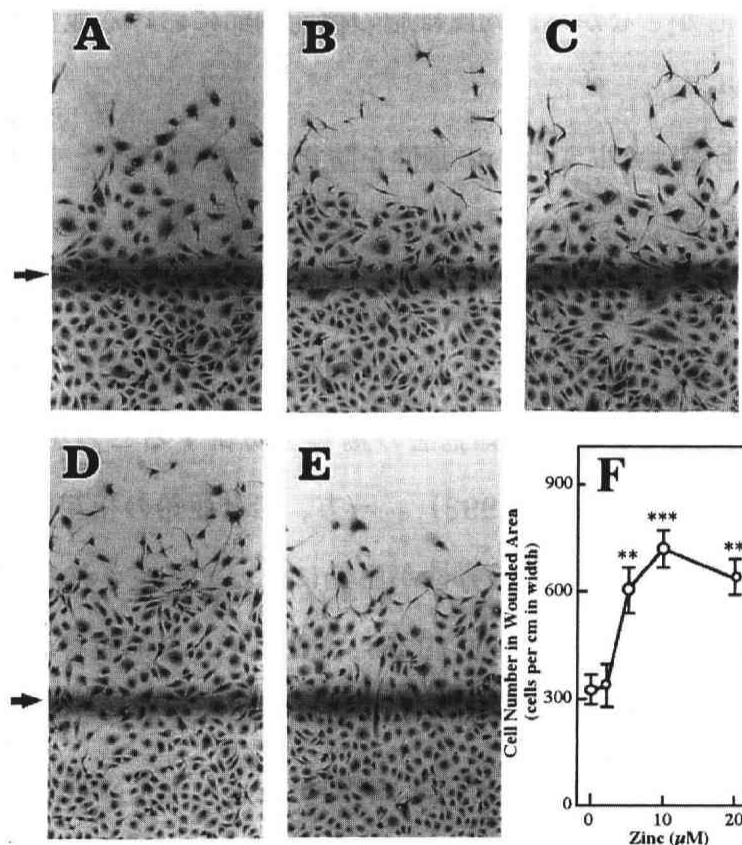


Fig. III-1. Morphological observation of the wounded edge of vascular endothelial cell cultures. Confluent cultures of bovine aortic endothelial cells were wounded and incubated at 37°C for 48 h in the presence of zinc sulfate at 2.0, 5.0, 10 or 20 μM . Giemsa stain (x 40). (A) Control; (B) Zinc (2.0 μM) treatment; (C) Zinc (5.0 μM) treatment; (D) Zinc (10 μM) treatment; (E) Zinc (20 μM) treatment; (F) the cell number appeared in the wounded area. Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the control, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Arrows indicate the wounded edge.

次に修復の重要な構成部分である内皮増殖に対する亜鉛の作用について検討した。Fig. III-2 に、増殖期の内皮細胞数に対する亜鉛の作用を示す。24 時間処理後において、2 μM 以上の亜鉛による細胞数の有意な増加が認められた。また、内皮細胞への ^3H チミジンおよび ^{14}C ロイシンの取り込みに対する亜鉛の作用を検討したところ、Fig. III-3 に示すように、亜鉛による取り込みの顕著な増加が認められた。これらの結果は、亜鉛が、内皮細胞の増殖および蛋白合成を亢進させることを示しており、これが亜鉛による傷害内皮細胞層の修復促進に関連しているものと推察される。

血管内皮傷害時には、重篤に傷害された内皮細胞から逸脱した塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が、近傍の内皮細胞の遊走と増殖を促進させて速やかな内皮修復を行うとされる。そこで、亜鉛の内皮細胞増殖促進作用における内因性 bFGF の関与について検討したところ、Fig. III-4 に示すように、亜鉛は単独で ^3H チミジンの取り込みを有意に増加させたが、抗 bFGF 中和抗体による内因性の bFGF の枯渇によって内皮細胞の増殖が抑制された状態においては、この金属による増殖促進作用が認められなかった。

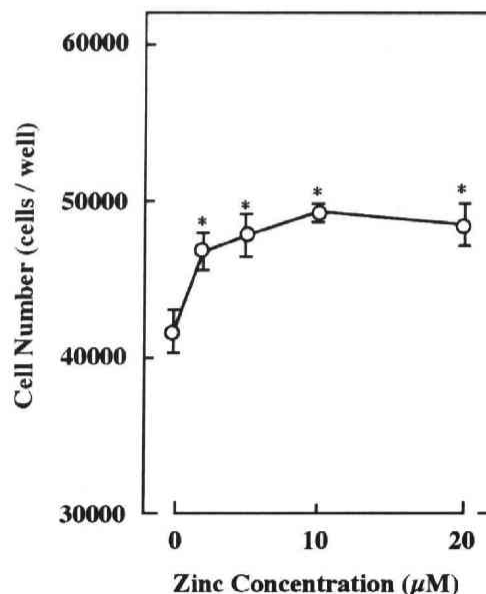


Fig. III-2. Effect of zinc on the number of growing vascular endothelial cells. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of zinc sulfate at 2.0, 5.0, 10 or 20 μM . Values are means \pm S.E. of four samples. Significantly different from the control, * $P < 0.05$.

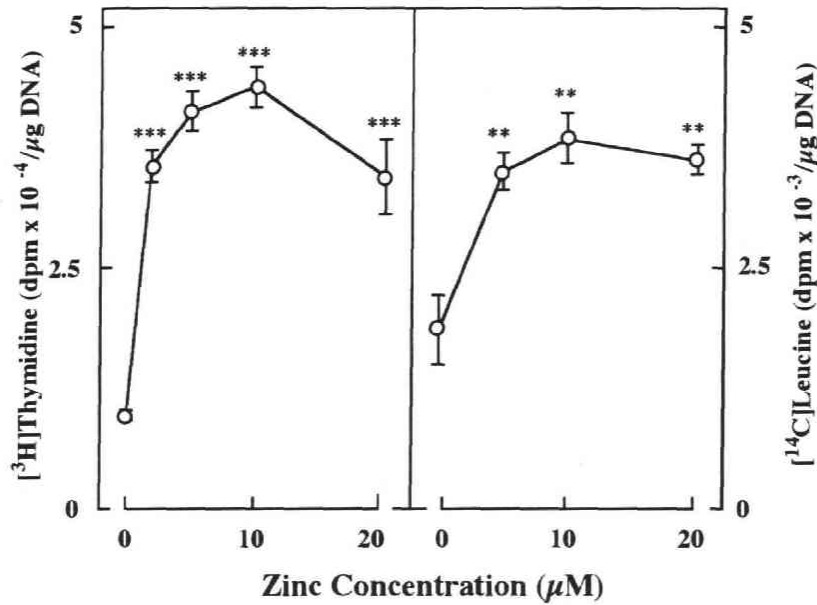


Fig. III-3. Effect of zinc on the incorporation of [³H]thymidine (left panel) and [¹⁴C]leucine (right panel) into the acid-insoluble fraction of cultured vascular endothelial cells. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of zinc sulfate at 2.0, 5.0, 10 or 20 μM and labeled with [³H]thymidine and [¹⁴C]leucine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the control, ***P*<0.01; ****P*<0.001.

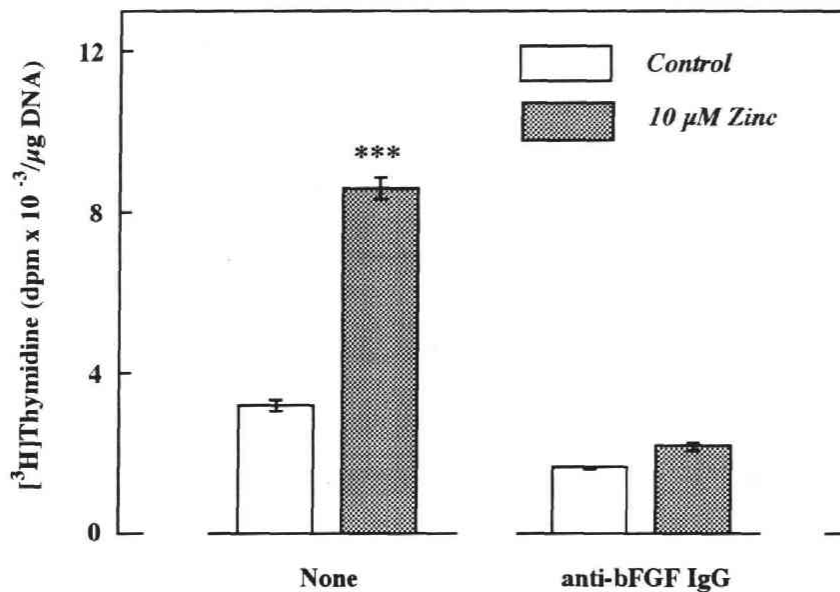


Fig. III-4. Effect of anti-bFGF IgG on zinc-induced increase in the incorporation of [³H]thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular endothelial cells. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of zinc sulfate at 10 μM combined with or without anti-bFGF IgG at 5.0 μg/ml and labeled with [³H]thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, ****P*<0.001.

次に、傷害された内皮細胞層の修復に対する亜鉛と bFGF との相互作用を検討した。Fig. III-5 に示すように、傷害部位に現れた内皮細胞数を bFGF は単独で濃度依存的に有意に増加させ、亜鉛はこの傷害内皮修復促進作用をさらに有意に増強させた。また、内皮細胞の DNA 合成に対する亜鉛と bFGF の相互作用を検討したところ、Table III-1 に示すように、内皮細胞への $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みに対する bFGF の促進作用も亜鉛によって有意に増強された。しかしながら、銅、マンガンおよびニッケルなどの亜鉛以外の重金属には、そのような作用は認められなかった。従って、亜鉛は、bFGF による内皮増殖促進作用を増強することによって内皮修復を促進する特有な重金属であると考えられる。

Fig. III-6 に、血管平滑筋細胞の増殖に対する亜鉛の作用を検討した結果を示す。20 μM 以下の亜鉛では、血管平滑筋細胞による $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みおよび 24 時間処理後の細胞数に有意な変化は認められず、この金属が単独では血管平滑筋細胞の増殖に影響を及ぼさないことが示された。しかしながら、bFGF 存在下における亜鉛の作用を検討したところ、Table III-2 に示すように、bFGF による血管平滑筋細胞

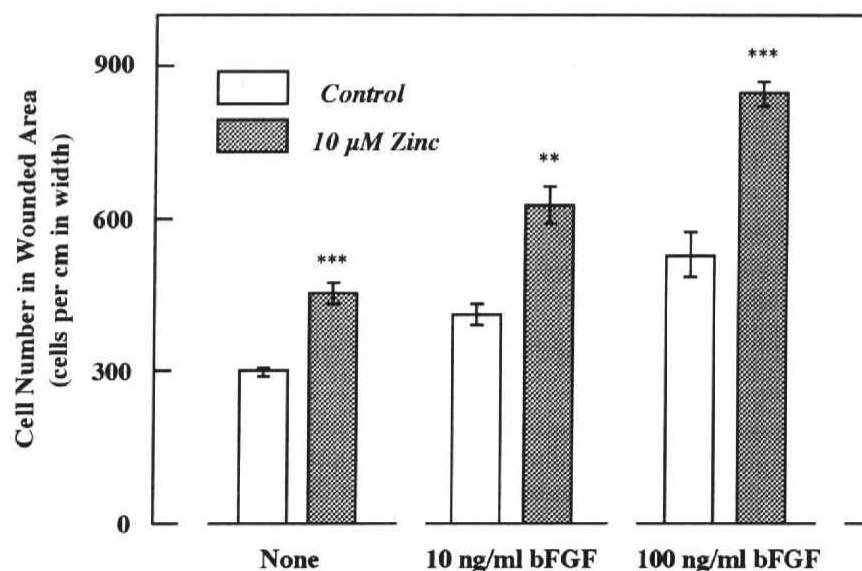


Fig. III-5. Interaction of zinc with bFGF on the cell number found in the wounded area of cultured vascular endothelial cell layer. Confluent cultures of bovine aortic endothelial cells were wounded and incubated at 37°C for 24 h in the presence of zinc sulfate at 10 μM with or without bFGF at 10 or 100 ng/ml. Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding "Absence of zinc", ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Table III-1

Interaction of zinc, copper, manganese or nickel with bFGF on the incorporation of [^3H]thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular endothelial cells

	[^3H]Thymidine incorporation (dpm/ μg DNA)	
	Absence of bFGF	Presence of bFGF
Control	4 440 \pm 130	6 795 \pm 447
Zinc	11 822 \pm 1 387*	27 862 \pm 2 107**
Copper	4 647 \pm 632	7 275 \pm 102
Manganese	3 936 \pm 600	7 187 \pm 365
Nickel	3 615 \pm 307	6 910 \pm 422

Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of zinc sulfate, copper chloride, manganese chloride or nickel chloride at 10 μM each combined with or without bFGF at 10 ng/ml and labeled with [^3H]thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, * P <0.05; ** P <0.01.

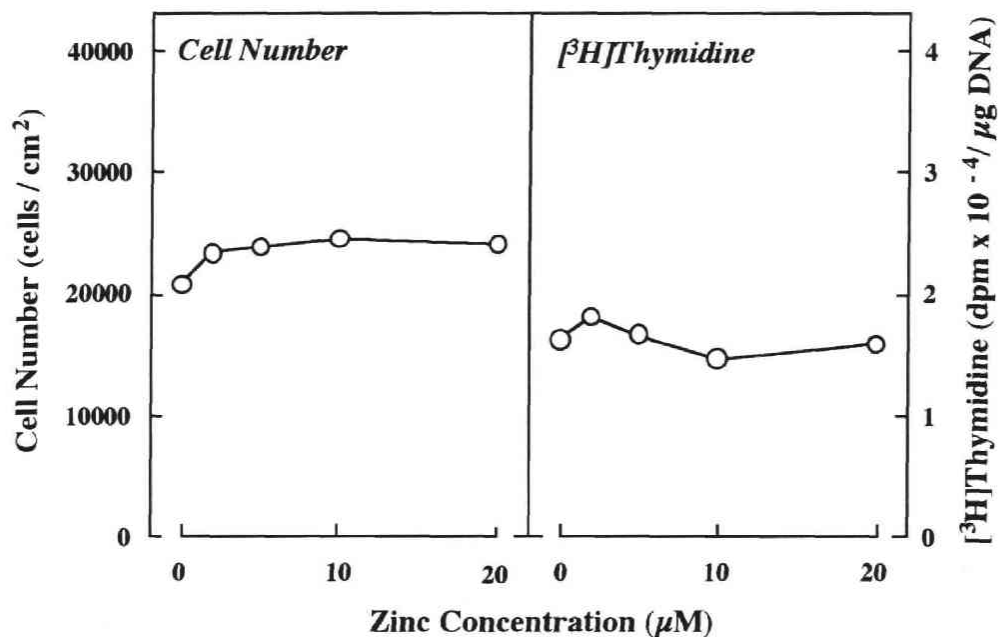


Fig. III-6. Effect of zinc on the number (left panel) and the incorporation of [^3H]thymidine into the acid-insoluble fraction (right panel) of growing vascular smooth muscle cells. Growing cultures of bovine aortic smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of zinc sulfate at 2.0, 5.0, 10 or 20 μM and labeled with or without [^3H]thymidine during the last 6 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of four samples. All S.E. values are smaller than the corresponding symbols.

への[^3H]チミジンの取り込み促進がこの金属によって有意に増強された。この結果から、血管平滑筋細胞においても亜鉛がbFGFの活性を増強し得るものと考えられる。

Table III-2

Interaction of zinc with bFGF on the incorporation of [^3H]thymidine into the acid-insoluble fraction of growing vascular smooth muscle cells

	[^3H]Thymidine incorporation (dpm $\times 10^{-1}/\mu\text{g DNA}$)	
	Absence of bFGF	Presence of 10 ng/ml bFGF
Control	301 \pm 43	3 553 \pm 339
10 μM Zinc	349 \pm 54	5 759 \pm 244

Growing cultures of bovine aortic smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of zinc sulfate at 10 μM combined with or without bFGF at 10 ng/ml and labeled with [^3H]thymidine during the last 6 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of four samples.

The stimulatory effect of bFGF is significant ($P < 0.05$).

The augmentative effect of zinc on the stimulation by bFGF is significant ($P < 0.05$).

第2節 亜鉛の傷害内皮修復促進作用に対する鉛の阻害作用

これまでの検討結果によって、亜鉛が内因性 bFGF に依存的に内皮増殖を刺激して傷害された内皮細胞の修復を促進することが判明し、さらにこれとは対照的に、鉛が内因性の bFGF の応答性を低下させることによって内皮増殖を阻害して内皮修復を抑制することが示された。そこで、本節では傷害血管内皮細胞層の修復に対する亜鉛と鉛の相互作用を検討した。

Fig. III-7 に、傷害された内皮細胞層の修復に対する亜鉛と鉛の相互作用を形態学的に検討した結果を示す。基線を越えて傷害部位に現れた内皮細胞数は鉛の濃度依存的に減少した (Fig. III-7B, C)。一方、亜鉛は単独で傷害部位の細胞数を増加させた (Fig. III-7D) が、鉛が共存した場合 (Fig. III-7E, F) その促進作用は消失し、むしろ鉛による抑制が観察された。このとき、鉛による細胞の退行性変化は認められなかった。基線を越えて傷害部位に現れた内皮細胞数を計測したところ、Fig. III-8 に示すように、亜鉛は傷害部位の内皮細胞数を有意に増加させたが、鉛の共存下では亜鉛による有意な変化は認められなかった。

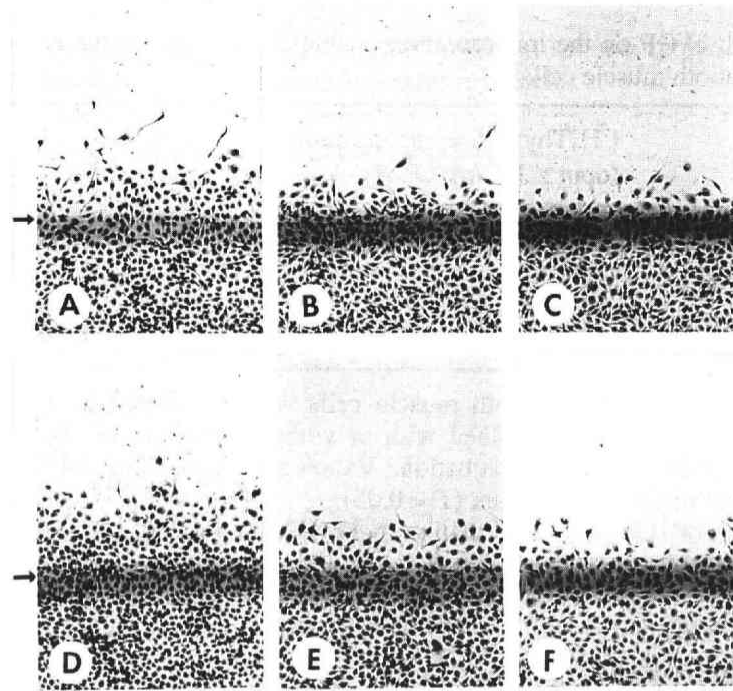


Fig. III-7. Morphological observation of the wounded edge of vascular endothelial cell cultures. Confluent cultures of bovine aortic endothelial cells were wounded and incubated at 37°C for 48 h in the presence of lead nitrate at 5.0 or 10 μ M combined with or without zinc sulfate at 10 μ M. Giemsa stain (x 40). (A) Control; (B) Lead (5.0 μ M) treatment; (C) Lead (10 μ M) treatment; (D) Zinc (10 μ M) treatment; (E) Lead (5.0 μ M) plus zinc (10 μ M) treatment; (F) Lead (10 μ M) plus zinc (10 μ M) treatment. Arrows indicate the wounded edge.

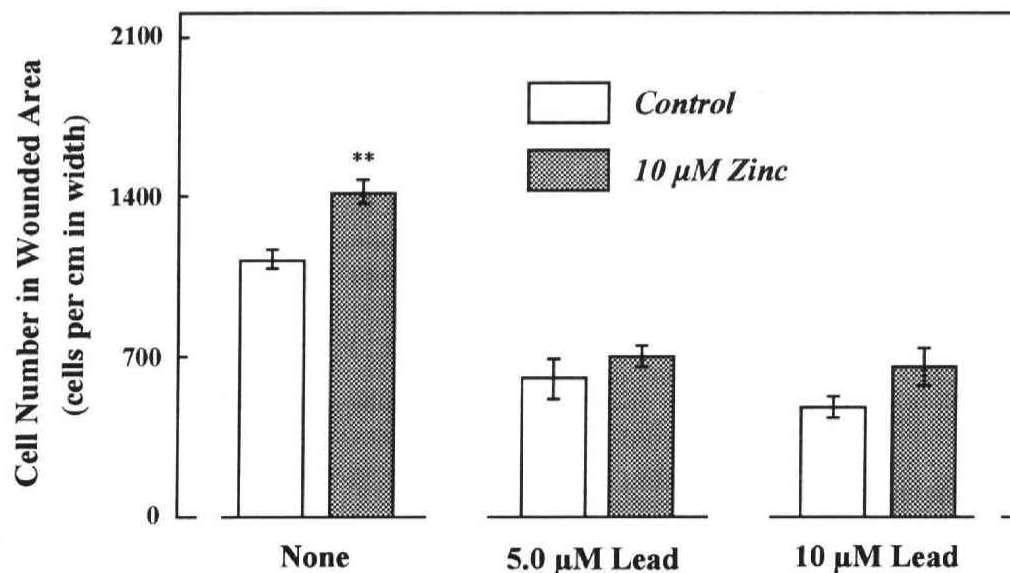


Fig. III-8. Interaction of lead with zinc on the cell number found in the wounded area of cultured vascular endothelial cell layer. Confluent cultures of bovine aortic endothelial cells were wounded and incubated at 37°C for 48 h in the presence of lead nitrate at 5.0 or 10 μ M combined with or without zinc sulfate at 10 μ M. Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, ** P <0.01.

亜鉛の内皮修復促進作用の鉛による阻害は、亜鉛による増殖刺激が鉛によって阻害された結果である可能性が考えられる。そこで、内皮増殖に対する亜鉛と鉛の相互作用を検討した。Fig. III-9 に、亜鉛存在下および非存在下、鉛で 24 時間処理した増殖期の内皮細胞の形態学的変化を示す。鉛は単独で内皮細胞数を減少させたが (Fig. III-9B, C)、亜鉛は単独でそれを増加させた (Fig. III-9D)。亜鉛と鉛が共存した場合 (Fig. III-9E, F)、細胞の退行性変化を伴うことなく亜鉛による細胞数の増加は抑制された。また、内皮細胞の DNA 合成に対する亜鉛と鉛の相互作用を検討したところ、5 μM 以上の亜鉛による $[\text{H}]$ チミジンの取り込みの有意な増加が観察されたが、この現象は 10 μM の鉛の存在下では認められなかった (Fig. III-10)。さらに、増殖期の内皮細胞を亜鉛の存在下および非存在下、鉛で処理したときに培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を調べたが、Table III-3に示すように、その活性は有意に変化しなかった。従って、亜鉛による内皮修復促進に対する鉛の

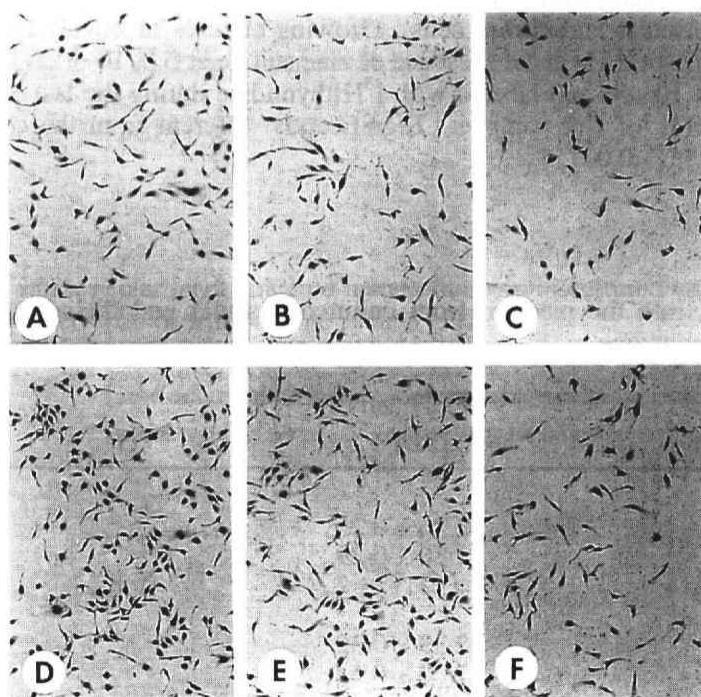


Fig. III-9. Morphological observation of growing cultures of vascular endothelial cells after exposure to lead, zinc or both. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 5.0 or 10 μM combined with or without zinc sulfate at 10 μM . Giemsa stain (x 40). (A) Control; (B) Lead (5.0 μM) treatment; (C) Lead (10 μM) treatment; (D) Zinc (10 μM) treatment; (E) Lead (5.0 μM) plus zinc (10 μM) treatment; (F) Lead (10 μM) plus zinc (10 μM) treatment.

阻害作用は、2つの重金属が共存したことによる非特異的な細胞傷害の増強のためではなく、亜鉛の内皮増殖促進作用の鉛による阻害に起因すると考えられる。

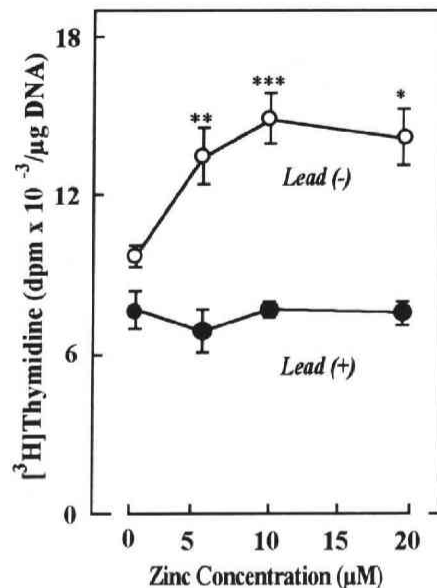


Fig. III-10. Interaction of lead with zinc on the incorporation of [³H]thymidine into the acid-insoluble fraction of cultured vascular endothelial cells. Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of zinc sulfate at 5.0, 10 or 20 μM combined with or without lead nitrate at 10 μM and labeled with [³H]thymidine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of five samples. Significantly different from the corresponding control, **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

Table III-3

The leakage of LDH into the medium from cultured vascular endothelial cells treated with lead combined with or without zinc

	LDH activity (IU/L)
Absence of lead	
Control	2.26 ± 0.25
10 μM zinc	1.86 ± 0.29
Presence of 5.0 μM lead	
Control	2.39 ± 0.32
10 μM zinc	2.00 ± 0.55
Presence of 10 μM lead	
Control	2.41 ± 0.04
10 μM zinc	2.31 ± 0.11

Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence of lead nitrate at 5.0 or 10 μM combined with or without zinc sulfate at 10 μM. Values are means ± S.E. of four samples. The effect of neither lead nor zinc is significant.

カドミウムの細胞毒性による内皮細胞層の傷害に対する亜鉛の軽減効果は、亜鉛が細胞内へのカドミウムの蓄積を減少させることに起因している (Kaji et al., 1992c; Kaji et al., 1993)。このことから、亜鉛の傷害内皮修復作用に対する鉛の阻害作用の機序として、両金属共存による細胞内への鉛または亜鉛の蓄積量の変動を考えることができる。一方、亜鉛などの重金属と強固に結合する蛋白質としてメタロチオネインが知られているが、この蛋白質の合成は様々な重金属によって誘導される。従って、合成誘導されたメタロチオネインによって細胞内亜鉛がトラップされた可能性も否定できない。そこで、亜鉛の存在下および非存在下、鉛で24時間処理した内皮細胞における鉛、亜鉛およびメタロチオネインの濃度を測定した。その結果、Table III-4 に示すように、細胞内への鉛の蓄積量は亜鉛によって有意に増加したが、細胞内への亜鉛の蓄積は鉛による影響を受けなかった。細胞内メタロチオネイン量については、亜鉛および鉛の単独処理による増加が認められたが、鉛と亜鉛が共存した場合の濃度は亜鉛単独時よりも低い値を示した。しかしながら、内皮細胞におけるこれらの重金属によるメタロチオネインの誘導量は、カドミウムによるそれ (Kaji et al., 1996b) と比べるとわずかであった。

Table III-4

The accumulation of intracellular lead, zinc and metallothionein in cultured vascular endothelial cells treated with lead combined with or without zinc

	Lead accumulation (nmol/ μ g DNA)	Zinc accumulation (nmol/ μ g DNA)	Metallothionein content (μ g/ μ g DNA)
Absence of lead			
Control	N. D.	4.39 \pm 0.62	12.4 \pm 1.46
10 μ M zinc	N. D.	7.42 \pm 0.96*	23.8 \pm 1.95**
Presence of 10 μ M lead			
Control	2.38 \pm 0.18	5.97 \pm 0.39	16.0 \pm 0.69
10 μ M zinc	4.04 \pm 0.11**	6.06 \pm 0.41	19.3 \pm 0.94*

Growing cultures of bovine aortic endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h with or without lead nitrate at 10 μ M combined with or without zinc sulfate at 10 μ M. Values are means \pm S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, * P <0.05; ** P <0.01. N. D., not detected.

第3節 考察

本章において、必須微量元素である亜鉛が内皮細胞の増殖を亢進させることによって傷害された内皮細胞層の修復を促進することが示された。すなわち、傷害内皮の修復過程において、内皮細胞は亜鉛と鉛に対して全く逆の応答を示すことが明らかとなった。亜鉛は不飽和脂肪酸 (Wilkins and Leak, 1994) やカドミウム (Kaji et al., 1992c) による血管内皮細胞の傷害を防御する重金属であり、またその欠乏が内皮細胞の障壁としての機能を著しく低下させること (Henning et al., 1992) から、この金属は内皮細胞層の維持において生理的に重要な役割を果たしているものと考えられている。本章の実験結果は、亜鉛の役割のひとつが内皮増殖の刺激に基づく傷害内皮の修復促進である可能性を示している。

亜鉛による血管内皮細胞への $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み促進作用が抗 bFGF 中和抗体存在下では認められなかったことから、この金属の内皮増殖促進作用は内因性の bFGF に依存していると考えられる。また、外因性 bFGF による内皮細胞への $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み促進が、亜鉛によって特異的に増強されたことから、この金属は bFGF の活性を増強する特有な金属であり、内因性 bFGF の活性の増強を通じて内皮細胞増殖が促進され、その結果として傷害内皮の修復が促進されるという機序が考えられる。また、血管内皮傷害時に内皮細胞が bFGF に大量に曝露したとき、亜鉛が bFGF の活性の増強を通じて速やかな内皮修復に寄与する可能性が示唆された。従って、亜鉛が必須微量元素として bFGF の活性化に関与している可能性も否定できない。亜鉛による bFGF 活性の増強作用のメカニズムについては、(i) 内皮細胞および血管平滑筋細胞における bFGF およびそのレセプターの発現の促進、(ii) bFGF のレセプターへの結合の直接的な促進、(iii) 大型 HSPG 分子種パルカンの合成促進、および (iv) bFGF の刺激を細胞内に伝達するシグナルトランスダクションの増強、などの可能性が考えられるが、現在のところ未解決の問題である。

様々な生物において、亜鉛が鉛の毒性を軽減することが報告されている。例えば、ラットにおいて、鉛中毒時に認められる δ -アミノレブリン酸脱水素酵素の活性低下は亜鉛投与によって軽減される (Finelli et al., 1975)。また、鉛の毒性に対する亜鉛の防御効果は、鉛の吸収阻害による生体レベルでのその蓄積減少あるいはこの金属によって誘発される生物学的障害の直接的な回復によるとの考え方もある (Petering, 1978)。しかしながら、本章において、亜鉛存在下においても、鉛は傷害された内皮細胞層の修復を阻害することが示された。換言すれば、毒性発現レベルの鉛が存在するときには、亜鉛は傷害内皮の修復を促進することができないことになる。従って、鉛が誘発する動脈硬化などの血管病変の発症には内皮修復に対する亜鉛の促進活性の低下が含まれる可能性も考えられる。

内皮細胞増殖は鉛と亜鉛に対して全く逆の応答をすることが示されたが、両者が共存した場合、亜鉛による内皮細胞増殖の刺激は鉛によって阻害された。すなわち、鉛は亜鉛による内皮増殖刺激を阻害する結果、亜鉛の内皮修復を阻害することが示唆された。血管内皮細胞において、亜鉛は、カドミウムの細胞内への蓄積を減少させることによってその細胞毒性を軽減させる (Kaji et al., 1992c) が、このような作用は鉛に対しては認められず、細胞内への鉛の蓄積量は亜鉛によって有意に増加することが示された。また、亜鉛の蓄積量は鉛による影響を受けず、さらに、亜鉛によるメタロチオネイン濃度の増加は鉛の共存によって減少した。従って、鉛が亜鉛の内皮増殖刺激を阻害する機序として、鉛による細胞内亜鉛量の減少やメタロチオネインによる細胞内亜鉛の隔離の増加は考えられず、細胞内への鉛の蓄積が亜鉛によって増加することに起因する可能性が高い。亜鉛は内因性 bFGF の活性の増強を介して内皮増殖を刺激するので、内皮細胞内に蓄積した鉛がヘパラン硫酸の産生を阻害して内因性 bFGF の活性を低下させ、その結果、亜鉛の増殖促進作用が消失するのかもしれない。

結論

動脈硬化症を含む血管病変を誘発するとされる鉛の細胞レベルでの毒性発現を明らかにする目的で、傷害血管内皮の修復に対するこの金属の毒性発現を細胞培養系を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 鉛による血管内皮修復の阻害

鉛が血管内皮細胞の増殖を強く抑制することにより、傷害内皮細胞層の修復を阻害することを見いだした。一方、血管平滑筋細胞に対しては、鉛はその増殖を直接的に促進することが判明した。これらの結果から、鉛は血管内皮細胞に対してはその細胞層の傷害後の修復の過程で毒性を発現し、血管平滑筋細胞に対してはその増殖を促進し、結果として動脈硬化を含む血管病変の発症と進展に深く関わると考えられる。なお、以上述べた作用は他の重金属には認められないことから、鉛に特有のものである可能性が考えられる。

2. 鉛による内皮増殖の阻害機序

鉛による血管内皮細胞の増殖の阻害が、内皮細胞のヘパラン硫酸産生の抑制に起因する内因性の bFGF に対する応答性の低下によることが判明した。このヘパラン硫酸産生の抑制が、ヘパラン硫酸糖鎖の短縮およびコア蛋白当たりのヘパラン硫酸糖鎖数の減少ではなく、主としてパールカンコア蛋白の合成阻害によるパールカン分子数の減少に起因することが明らかとなった。鉛が増殖期の血管内皮細胞において、bFGF のレセプターへの結合を促進する唯一のプロテオグリカン分子種であるパールカン分子の産生を阻害するため、内因性の bFGF のヘパラン硫酸への結合量が減少し、結果的にこの細胞の bFGF に対する応答性が低下するために増殖が阻害されると考えられる。

3. 内皮修復に対する鉛と亜鉛の相互作用

亜鉛が内因性 bFGF 活性の増強を介して内皮細胞の増殖を亢進させて、傷害内皮細胞層の修復を促進することが示された。亜鉛は bFGF の活性を増強する特有な重金属であり、本研究で明らかになった鉛の作用と相反する作用を有することが示唆された。しかしながら、このような亜鉛の作用は鉛によって強く阻害され、亜鉛が鉛の内皮修復阻害作用に対する有効な軽減効果を示さないことが示された。従って、内皮細胞層の維持に対する鉛の毒性発現機構として、亜鉛の生理的な活性の阻害が含まれることが推察される。

以上から、鉛が誘発する動脈硬化病変などの血管病変の形成に、血管内皮細胞層傷害後の修復阻害と血管平滑筋細胞の増殖促進が関与していることが示唆されるとともに、内皮修復の阻害に決定的な内皮増殖の抑制が、内皮細胞によるパルカンコア蛋白の合成阻害に基づく内因性の bFGF の availability の低下に起因することが示された。

謝辞

本研究論文をまとめるに際し、懇篤なる御助言と御高見を賜りました東北大学大学院薬学研究科 永沼 章 教授に深甚なる感謝の意を表しますとともに、本稿の御校閲を頂きました東北大学大学院薬学研究科 大内和雄 教授および大泉 康 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究は、北陸大学薬学部 鍛冶利幸 助教授の終始、御懇切なる御指導と御鞭撻によるものであり、厚く御礼を申し上げますとともに謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、御助言、御教示を賜りました富山医科薬科大学 狐塚 寛 名誉教授、富山医科薬科大学医学部 小泉富美朝 教授ならびに北陸大学薬学部 坂元倫子 教授に深甚なる謝意を表します。

また、ウシ大動脈由来血管内皮細胞および血管平滑筋細胞を供与してくださいました九州大学医学部 居石克夫 教授および中島 豊 助教授、抗パールカンコア蛋白抗体を供与してくださいました米国 Shriners Hospital for Crippled Children の John Hassel 博士、ならびにプロテオグリカン解析法を御教授いただいた米国 University of Washington の Thomas N. Wight 教授および Michael G. Kinsella 准教授に深く感謝致します。

さらに、本研究過程において多くの御助言、御協力をいただきました北陸大学薬学部 山本千夏 博士、三島 篤 博士、宮島三和子 助手、櫻井 繁 修士、星野美穂 学士、渡辺さほり 学士をはじめとする、関係諸氏、諸賢に心よりお礼申し上げます。

第Ⅳ章 実験の部

1. 実験材料

ウシ大動脈由来血管内皮細胞およびウシ大動脈由来血管平滑筋細胞は、九州大学医学部病理学第一教室の居石克夫教授および中島 豊助教授より供与された。Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) 培地、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) および Ca, Mg 不含リン酸緩衝液 (CMF-PBS) は、ニッスイ製薬 (東京) より、ASF 301 培地は、味の素 (東京) よりそれぞれ購入した。牛胎児血清 (FBS) は、Summit (Ft. Collins, CO, USA) から購入した。組織培養ディッシュおよびプレートは、岩城硝子 (東京) より購入した。[Methyl-³H]チミジン (740 GBq/mmol)、L-[¹⁴C (U)]ロイシン (13.6 GBq/mmol)、D-[6-³H]グルコサミン塩酸塩 (1480 GBq/mmol)、[³⁵S]硫酸ナトリウム (carrier free)、[¹²⁵I]Bolton Hunter labeled 組み換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) (400 kBq/μg) および Enlightening Enhancer は、New England Nuclear (Boston, MA, USA) より購入した。Tran ³⁵S-label metabolic labeling reagent (consist of ~70% L-[³⁵S]methionine, ~15% L-[³⁵S]cysteine and other ³⁵S-labeled compounds; 44.62 TBq/mmol) は、ICN Pharmaceuticals (Irvine, CA, USA) より購入した。組み換えヒト bFGF およびその中和抗体 (anti-bFGF IgG) は、それぞれ Genzyme (Cambridge, MA, USA) および Collaborative Biomedical Products (Bedford, MA, USA) より購入した。酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF) は、Austral Biologicals (San Ramon, CA, USA) より購入した。組み換えヒト血小板由来増殖因子 (PDGF) (BB-dimer) は、Oncogene Science (Manhasset, NY, USA) より購入した。3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasolium bromide (MTT) 細胞増殖測定キットは、Chemicon International (Temecula, CA, USA) より購入した。bFGF 測定キット、ECL ウェスタンブロッティング検出試液、Horseradish peroxidase-linked protein A、ニトロセルロースメンブレン (Hybound™ECL) およ

びハイパーフィルム ECL は、Amersham (England) より購入した。抗パールカンコア蛋白ウサギ抗体 (EY-9) は、John Hassell 博士 (Shriners Hospital for Crippled Children, Portland, OR, USA) より供与された。ミニカラム (10 ml-Biorad econocolumn) は、Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA) より購入した。Sephacrose CL-4B、Sephacrose CL-6B および PD-10 カラム (disposable Sephadex G-25) は、Pharmacia Biotech AB (Sweden) より購入した。トリプシン (1:250) およびゼラチンは、Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) より購入した。ジエチルアミノエチル (DEAE) -Sephacel、ベンザミジン塩酸、フェニルメタンスルフォニルフルオリド (PMSF)、トリスハイドロキシメチルアミノメタン (Tris base)、デキストランブルー、パパイン、ヘパリチナーゼ (EC 4.2.2.8. derived from *Flavobacterium heparinum*) およびヘパリン (derived from porcine intestinal mucosa) は、Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。プロナーゼおよびウシ血清アルブミン (BSA) は、Boehringer Mannheim (Germany) および Miles (Kankakee, IL, USA) よりそれぞれ購入した。コンドロイチン ABC リアーゼ (EC 4.2.2.4. derived from *Proteus vulgaris*) は、生化学工業 (東京) より購入した。尿素、フェノールレッド、過硫酸アンモニウム、乳酸脱水素酵素 (LDH) 測定キット およびトリプシンインヒビター (derived from soybean) は、和光純薬 (大阪) より購入した。X 線フィルム (XAR-5)、現像液 (GBX-developer and replenisher) および固定液 (GBX-fixer and replenisher) は、Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA) より購入した。ドデシル硫酸ナトリウム、塩化セチルピリジニウム (CPC)、HEPES、EDTA、EGTA、硝酸鉛、硫酸亜鉛およびその他の試薬は、ナカライテスク (京都) より購入した。

2. 細胞数の計測および細胞毒性

血管内皮細胞を 100 mm ディッシュ中で、37℃、5 % CO₂ in air の条件下で、10% FBS 含有 RPMI 1640 培地でコンフルエントまで培養した。この細胞を 24 穴

培養プレートに 1×10^4 cells/cm² の密度で播種し、10% FBS 含有 RPMI 1640 培地中でさらに 24 時間培養し、増殖期の内皮細胞を調製した。培養後、培地を捨て、無血清 ASF 301 培地で細胞層を 2 回洗った。次に、新鮮な無血清 ASF 301 培地中で硝酸鉛 (0.5, 1.0, 2.0 または 5.0 μ M) で、37℃、24 時間処理した。処理後、培地を回収し、細胞層を CMF-PBS で洗い、細胞を 0.02% EDTA 含有 0.25% トリプシンで懸濁して回収した。各ウェルを CMF-PBS で洗い、洗液を対応する細胞懸濁液に合わせた。この細胞懸濁液にトリパンプルーを加えた後、その一部を取り、血球計算盤で生細胞数を計測した。別の実験においては、増殖期の血管内皮細胞または血管平滑筋細胞を新鮮な無血清 ASF 301 培地中で硫酸亜鉛 (2.0, 5.0, 10 または 20 μ M) で 24 時間処理し、処理後 MTT アッセイにより細胞数を計測した。また、処理後に回収した培地中に含まれる LDH 活性を測定し、非特異的細胞傷害 (細胞毒性) の指標とした。

3. DNA および蛋白合成

6 穴プレートに調製した増殖期の血管内皮細胞または血管平滑筋細胞を新鮮な無血清 ASF 301 培地中で硝酸鉛 (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 または 10 μ M)、硫酸亜鉛 (2.0, 5.0, 10 または 20 μ M) またはその両方で、37℃、24 時間処理した。血管内皮細胞においては処理終了前 3 時間に [³H]チミジン (10 kBq/ml) または [¹⁴C]ロイシン (25 kBq/ml) で、血管平滑筋細胞においては終了前 6 時間に [³H]チミジン (20 kBq/ml) でパルスラベルした。処理後、培地を除去し細胞層を氷冷 CMF-PBS で 2 回洗い、氷冷 CMF-PBS 存在下でラバーポリスマンで細胞層をかき取り、細胞懸濁液を回収した。回収後、ウェルを CMF-PBS で洗い、対応する細胞懸濁液に加えて超音波処理し、細胞ホモジネートを調製した。細胞ホモジネートの 5% トリクロロ酢酸不溶性画分への放射活性の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。ホモジネートの一部を蒸発乾固し、蛍光法による DNA の測定 (Kissane and Robins, 1958) に供した。

4. 形態学的観察

6 穴培養プレートに調製した増殖期の血管内皮細胞を、新鮮な無血清 ASF 301 培地中で、硝酸鉛 (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 または 10 μ M)、硫酸亜鉛 (10 μ M) またはその両方で、37℃、24 時間処理した。処理後、細胞層を CMF-PBS で 2 回洗い、メタノールで固定後、ギムザ液染色して光顕的観察を行った。

5. 傷害内皮細胞層の修復

血管内皮細胞を 6 穴プレートに 10% FBS 含有 RPMI 1640 培地でコンフルエントまで培養し、剃刀の刃をウェルの中央部の裏側にあらかじめ引いた基線に垂直に押し当て、剃刀のエッジに沿ってラバーポリスマンで細胞層の半面を削り取り、無血清 ASF 301 培地で細胞層を 2 回洗い、削り取った細胞を完全に取り除いた。残った細胞を新鮮な無血清 ASF 301 培地中で、硝酸鉛 (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 または 10 μ M)、硫酸亜鉛 (2.0, 5.0, 10 または 20 μ M) またはその両方で、37℃、24 または 48 時間処理した。処理終了後、細胞をギムザ液染色し、基線付近を形態学的に観察し、基線を越えて傷害部位に現れた細胞数を計測して修復の指標とした。

6. bFGF の定量

6 穴培養プレートに調製した増殖期の血管内皮細胞を新鮮な無血清 ASF 301 培地中で、硝酸鉛 (1.0, 2.0 または 5.0 μ M) で、37℃、48 時間処理した。処理後、培養プレートを氷上に移し、培地を取り除き、細胞層を氷冷 CMF-PBS で 3 回洗った。細胞層を氷冷 2 M 塩化ナトリウム含有 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5) で 2 回洗い、低親和性ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) に結合している bFGF を回収した (HSPG 画分)。次に、細胞層を氷冷 CMF-PBS で 1 回洗った後、氷冷 2 M 塩化ナトリウム含有 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で 2 回洗い、高親和性 FGF レセプターに結合した bFGF を回収した (FGF レセプター画分)。CMF-PBS で細胞層を 1 回洗った後、細胞層を 0.02 % EDTA 含有 0.25 % トリプ

シン溶液で 37℃、5 分間処理した。処理後、ウェルに 42 mM 大豆トリプシンインヒビターを加えトリプシンの反応を停止させた後、細胞懸濁液を回収した。ウェルを CMF-PBS で洗い、洗液を細胞懸濁液に合わせた。細胞懸濁液を 800 x g、3 分間遠心し、上清を取り除いた。沈殿した細胞を CMF-PBS で 1 回洗った後、プロテアーゼインヒビター (10 mM EDTA、0.1 M 6-アミノヘキサン酸、5 mM ベンザミジン塩酸塩および 1 mM PMSF) 含有 CMF-PBS を加え懸濁した後、凍結融解を 3 回繰り返し細胞膜を破壊し、18000 x g で 5 分間遠心した後、細胞内 bFGF を含んでいる上清を回収した (細胞内画分)。HSPG 画分、FGF レセプター画分および細胞内画分に含まれる bFGF を ELISA システム (Amersham Life Science, RDN 2158) を用いて定量した。細胞懸濁液の一部を用いて細胞数を計測し、各画分の bFGF の含量を pg/10⁵ cells で表した。

7. 細胞表面の HSPGs および FGF レセプターへの bFGF の結合

6 穴培養プレートに播種した血管内皮細胞を 10% FBS 含有 RPMI 1640 培地中でサブコンフルエントまで培養した。プレートを氷上に移し、培地を捨て、氷冷 CMF-PBS で細胞層を 3 回洗い、4 ng/ml [¹²⁵I]bFGF を含む結合培地 (DMEM、0.15%ゼラチン、20 mM HEPES、pH 7.5) 中で、硝酸鉛 (1.0, 2.0 または 5.0 μM) 存在下、4℃、3 時間インキュベートした。インキュベート後、細胞層を氷冷 0.1% BSA 含有 CMF-PBS で 3 回洗い、上記と同じ方法で HSPG 画分および FGF レセプター画分を調製した。各画分に含まれる [¹²⁵I]bFGF の放射活性をガンマカウンターを用いて測定した。1 μg/ml 非放射性 bFGF 存在下で同様に [¹²⁵I]bFGF の結合を測定し非特異的結合とし、各画分の放射活性の値から差し引いた。

8. 血管内皮細胞グリコサミノグリカンへの [³H]グルコサミンおよび [³⁵S]硫酸の取り込み

6 穴培養プレートに調製した増殖期の血管内皮細胞を、200 kBq/ml [³H]グルコ

サミンおよび 740 kBq/ml [³⁵S]硫酸を含む無血清 ASF 301 培地中で、硝酸鉛 (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 または 2.0 μM) で、37℃、48 時間処理した。処理後、培地を回収し、細胞層を CMF-PBS で洗い、洗液を回収した培地に加えた (Medium 画分)。細胞層を 0.02% EDTA 含有 0.25% トリプシン溶液で 37℃、5 分間処理後、細胞懸濁液を回収し、CMF-PBS でウェルを洗い回収した細胞懸濁液に加えた。この細胞懸濁液を 1500 x g、15 分間遠心して上清を回収し、これを Cell surface 画分とした (Gill et al., 1981)。残った沈殿に CMF-PBS を加えた後、超音波処理し、乾燥後、蛍光法によって DNA を定量した。Medium 画分および Cell surface 画分中のグリコサミノグリカンに取り込まれた放射活性を CPC 沈殿法 (Wasteson et al., 1973) によって測定した。すなわち、各画分を 3 mg/ml プロナーゼ存在下、50℃で 3 時間水浴中でインキュベートした。次に、キャリアーとしてコンドロイチン硫酸 A (4 mg/ml) および CPC (0.5%) を加えて 37℃ で 30 分間処理した。処理後、1500 x g で 10 分間遠心し、グリコサミノグリカン—CPC 複合体を沈殿させた。沈殿物を 4 M 塩化ナトリウム溶液で溶解し、80% エタノールを加えて再び懸濁させ、1500 x g で 10 分間遠心した。上清を除去し、沈殿を蒸留水に溶解し、溶液中の放射性活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。得られた結果は対応する DNA 量で補正し、dpm/μg DNA として表した。

9. 血管内皮細胞プロテオグリカンの解析

9.1. 血管内皮細胞プロテオグリカンの抽出

100 mm デイッシュに調製した増殖期の血管内皮細胞を、3.7 MBq/ml [³⁵S]硫酸を含む無血清 ASF 301 培地中で、硝酸鉛 (2 μM) で、37℃、48 時間処理した。処理後、培地を回収し、終濃度が 8 M となるように尿素を加え、培地画分とした。細胞層を氷冷 CMF-PBS で洗い、8 M 尿素、0.1 M アミノヘキサン酸、5 mM ベンザミジン塩酸、10 mM N-エチルマレイミド、2 mM EDTA、0.1 M 塩化ナトリウム、50 mM Tris base、0.1 M PMSF および 2 % Triton X-100 を含む細胞抽出液 (pH

7.5) を加え、4℃ で 15 分間抽出した。抽出後、ラバーポリスマンで細胞層を回収し、細胞抽出液でディッシュを洗い、洗液を回収液に加え細胞層画分とした。別に、内皮細胞を $[^{35}\text{S}]$ 硫酸を含まない無血清 ASF 301 培地中で同じ条件下で鉛処理し、細胞数を計測し、放射活性の補正に用いた。

9.2. DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィーによる内皮細胞プロテオグリカンの分離およびゲルろ過による内皮細胞 HSPGs の分析

培地および細胞層から得られた抽出液を 0.1 M 塩化ナトリウム含有 8 M 尿素緩衝液 (8 M 尿素、2 mM EDTA、50 mM Tris base、0.5% Triton X-100、pH 7.5) に平衡化した PD-10 カラムでゲルろ過し、分子量 3000 以上の画分を得た。得られた放射活性を別に計測した細胞数で補正後、DEAE-Sephacel カラム (5 ml) にアプライし、8 M 尿素緩衝液 30 ml でカラムを洗った後、同緩衝液中で 0.1 M から 0.7 M まで直線的な NaCl 濃度勾配をかけ、カラムに結合した陰性荷電物質を 10 ml/h の流速で順次溶出させ、荷電密度に基づく分離を行った。

別に、PD-10 カラムによって得た高分子量物質を 0.25 M 塩化ナトリウム含有 8 M 尿素緩衝液 (pH 7.5) に平衡化した DEAE-Sephacel ミニカラム (0.3 ml) にアプライし、同緩衝液でカラムを洗った後、3 M 塩化ナトリウム含有 8 M 尿素緩衝液 (pH 7.5) 0.9 ml で溶出し、放射活性なプロテオグリカンを濃縮した。濃縮サンプルの一部にキャリアーとして 80 mg/ml コンドロイチン硫酸 A を添加し、3 倍量の 1.3% 酢酸カリウム含有 95% エタノールを加え、プロテオグリカンを沈殿させた。HSPGs を得るために、0.1 mg/ml BSA および 3 mM 酢酸ナトリウム含有 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、1.7 U/ml コンドロイチン ABC リアーゼで、37℃、4 時間処理し、コンドロイチン/デルマタン硫酸鎖を消化した。消化したサンプルを Sepharose CL-4B カラム (0.9 x 80 cm) にアプライし、4 M 塩酸グアニジン緩衝液 (4 M 塩酸グアニジン、0.1 M 硫酸ナトリウム、0.1 M Tris base、2.5 mM EDTA、0.5% Triton X-100、pH 7.0) 中でゲルろ過を行い、HSPG サブクラス

の分離を行った。

残りの濃縮サンプルを3等分し、コンドロイチン ABC リアーゼで消化し、1.3 % 酢酸カリウム含有 95% エタノールで沈殿させ、以下のように処理した。(1) 0.2 M 塩化ナトリウム含有 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。(2) HSPGs からヘパラン硫酸鎖を得るために、5 mM EDTA および 5 mM システイン含有 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 中で、30 mg/ml パパインで、65℃、4 時間処理し、コア蛋白を消化した。(3) ヘパラン硫酸鎖を同定するために、10 mM 酢酸カルシウム含有 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、10 IU/ml ヘパリチナーゼで、37℃、4 時間処理し、ヘパラン硫酸鎖を分解した。処理後、Sephacrose CL-6B カラム (0.9 x 80 cm) にアプライし、0.2 M 塩化ナトリウム含有 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) でゲルろ過を行い、パパインおよびヘパリチナーゼ処理によるヘパラン硫酸糖鎖の分子量の変化を分析した。グリコサミノグリカンの分子量は、Wasteson (1971) によって示された K_{av} 値に対する糖鎖の分子量の対数曲線を用いて算出した。Void volume (V_o) および Total volume (V_t) は、デキストランブルーおよびフェノールレッドの溶出位置で見積もった。

9.3. コア蛋白の分析

100 mm ディッシュに調製した内皮細胞を、1 MBq/ml Tran ^{35}S -label metabolic labeling reagent を含む新鮮な無血清 ASF 301 培地中で、硝酸鉛 (2 μM) で 48 時間処理した。処理後、培地および細胞層から、8 M 尿素存在下、非会合条件下でプロテオグリカンを抽出し、培地画分および細胞層画分を得た。それぞれの画分を細胞数 (1×10^6 cells) で補正後、0.25 M 塩化ナトリウム含有 8 M 尿素緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-Sephacel ミニカラム (0.3 ml) にアプライし、同緩衝液 30 ml でカラムを洗った後、3 M 塩化ナトリウム含有 8 M 尿素緩衝液 (pH 7.5) 0.9 ml で溶出した。溶出液を 2 等分し、一方をヘパリチナーゼ処理した。処理後、各サンプルを還元条件下、4~12% ポリアクリルアミドグラジエントゲルにアプラ

イし、Laemmli (1970) の方法に従い SDS-PAGE を行い、Enlightning enhancer で処理後、ゲルを乾燥させ、 -70°C で Kodack XAR-2 フィルムを用いてフルオログラフィーを行った。別に、パールカンコアのウエスタンブロット分析を行うために、非放射性サンプルの SDS-PAGE ゲルを 25 mM トリス転写緩衝液 (25 mM Tris base、20% メタノール、pH 9.5) に平衡化し、ニトロセルロースメンブレンに 180 分間ブロッティングした。メンブレンをブロックした後、一次抗体 (EY-9、diluted 1:800) で、 4°C 、一晩インキュベートし、二次抗体 (horseradish peroxidase-linked protein A) を室温で 1 時間一次抗体に結合させた。二次抗体を ECL ウエスタンブロッティング検出試液により発色させ、Hyperfilm ECL 上で検出した。

10. 細胞内金属量およびメタロチオネイン量

60 mm ディッシュに調製した増殖期の血管内皮細胞を、新鮮な無血清 ASF 301 培地中で、硝酸鉛 ($10\ \mu\text{M}$)、硫酸亜鉛 ($10\ \mu\text{M}$) またはその両方で、 37°C 、24 時間処理した。処理後、培地を取り除き、氷冷 CMF-PBS で細胞層を 2 回洗った後、細胞層を氷冷 2 mM EGTA 含有 CMF-PBS で 3 回洗い、細胞層表面の金属を除去した (Blazka and Shaikh, 1991)。その後、細胞層を 0.25 M スクロース存在下、ラバーポリスマンでかき取って回収し、ウェルをスクロースで洗い、洗液を細胞懸濁液に加えた。細胞懸濁液を超音波処理し、ホモジネートを調製し、その一部をフレイムレス原子吸光光度計 (日本ジャーレルアッシュ社製 AA8500) による鉛および亜鉛の定量に供した。ホモジネート中のメタロチオネインを、以下に示すカドミウムヘモグロビン法 (Onosaka et al., 1978) により定量した。細胞ホモジネートのうち 0.5 ml をマイクロチューブに移し、0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml および $10\ \mu\text{g/ml}$ 塩化カドミウム 0.05 ml を加え混和後、室温に 10 分間放置した。放置後、2% ウシヘモグロビン 0.1 ml を加え、2 分間煮沸し、 $10000 \times g$ 、5 分間遠心した。これを 3 回繰り返した後、フレイムレス原子吸光光度計を用いて上清のカドミウム量を測定し、細胞内メタロチオネイン量を算出した。

1 1 . 統計学的処理

実験結果の統計的有意差は、Student の t -検定または分散分析で分析し、 $P < 0.05$ を有意とした。

引用文献

- Assoian, R. K. and Sporn, M. B. (1986) Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **102**, 1217-1223.
- Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G. and Yayon, A. (1994a) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis and angiogenesis. *Cell*, **79**, 1005-1013.
- Aviezer, D., Levy, E., Safran, M., Svahn, C., Buddecke, E., Schmidt, A., David, G., Vlodavsky, I. and Yayon, A. (1994b) Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to its receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 114-121.
- Bernfield, M., Hinkes, M. T. and Gallo, R. L. (1993) Developmental expression of the syndecans: possible function and regulation. *Develop. Suppl.*, 205-212.
- Blazka, M. E. and Shaikh, Z. A. (1991) Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: role of calcium channels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **110**, 355-363.
- Burk, R. R. (1973) A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 369-372.
- Carroll, R. E. (1966) The relationship of cadmium in the air to cardiovascular disease death rates. *J. Am. Med. Assoc.*, **198**, 267-269.
- Castellot, J. J. Jr., Favreau, L. V., Karnovsky, M. J. and Rosenberg, R. D. (1982) Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by endothelial cell-derived heparin. Possible role of a platelet endoglycosidase. *J. Biol. Chem.*, **257**, 11256-11260.
- Dingwall-Fordyce, I. and Lane, R. E. (1963) A follow-up study of lead workers. *Br. J. Ind. Med.*, **20**, 313-315.
- Esmon, C. T. and Owen, W. G. (1981) Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2249-2252.
- Finelli, V. N., Klauder, D. S., Karaffa, M. A. and Petering, H. G. (1975) Interaction of zinc and lead on δ -aminolevulinate dehydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**,

303-311.

- Flaumenhaft, R., Moscatelli, D., Saksela, O. and Rifkin, D. B. (1989) Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long-term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.*, **140**, 75-81.
- Gelehrter, T. D. and Sznycer-Laszuk, R. (1986) Thrombin induction of plasminogen activator-inhibitor in cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **77**, 165-169.
- Gill, P. J., Adler, J., Silbert, C. K. and Silbert, J. E. (1981) Removal of glycosaminoglycans from cultures of human skin fibroblasts. *Biochem. J.*, **194**, 299-307.
- Givol, D. and Yayon, A. (1992) Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J.*, **6**, 3362-3369.
- Goldstein, G. W. and Ar, D. (1983) Lead activates calmodulin-sensitive process. *Life Sci.*, **33**, 1001-1006.
- Gospodarowicz, D., Moran, J. S. and Braun, D. L. (1977) Control of proliferation of bovine vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, **91**, 377-385.
- Habermann, E., Crowell, K. and Janicki, P. (1983) Lead and other metals can substitute for Ca^{2+} in calmodulin. *Arch. Toxicol.*, **54**, 61-70.
- Haldenby, K. A., Chappell, D. C., Winlove, C. P., Parker, K. H. and Firth, J. A. (1994) Focal and regional variations in the composition of the glycocalyx of large vessel endothelium. *J. Vasc. Res.*, **31**, 2-9.
- Henning, B., Wang, Y., Ramasamy, S. and McClain, C. J. (1992) Zinc deficiency alters barrier function of cultured porcine endothelial cells. *J. Nutr.*, **122**, 1242-1247.
- Hook, M., Kjellen, L. and Johansson, S. (1984) Cell-surface glycosaminoglycans. *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 847-869.
- Houtman, J. P. (1993) Prolonged low-level cadmium intake and atherosclerosis. *Sci. Total Environ.*, **138**, 31-36.
- Iozzo, R. V., Cohen, I. R., Grassel, S. and Murdoch, A. D. (1994) The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem. J.*, **302**, 625-639.

- Järveläinen, H. T., Iruela-Arispe, M. L., Kinsella, M. G., Sandell, L. J., Sage, E. H. and Wight, T. N. (1992) Expression of decorin by sprouting bovine aortic endothelial cells exhibiting angiogenesis in vitro. *Exp. Cell Res.*, **203**, 395-401.
- Jaye, M., Schlessinger, J. and Dionne, C. A. (1992) Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1135**, 185-199.
- Johnson, D. E. and Williams, L. T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.*, **60**, 1-41.
- Kaji, T., Takata, M., Hoshino, T., Miyahara, T., Kozuka, H., Kurashige, Y. and Koizumi, F. (1988) Role of zinc in protection against cadmium-induced toxicity in formation of embryonic chick bone in tissue culture. *Toxicol. Lett.*, **44**, 219-227.
- Kaji, T., Yamamoto, C. and Sakamoto, M. (1991) Effect of lead on the glycosaminoglycans metabolism of bovine aortic endothelial cells in culture. *Toxicology*, **68**, 249-257.
- Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1992a) Inhibitory effect of lead on the release of tissue plasminogen activator from human vascular endothelial cells in culture. *Toxicology*, **73**, 219-227.
- Kaji, T., Mishima, A., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Koizumi, F. (1992b) Effect of cadmium on the monolayer maintenance of vascular endothelial cells in culture. *Toxicology*, **71**, 267-276.
- Kaji, T., Mishima, A., Koyanagi, E., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1992c) Possible mechanism for zinc protection against cadmium cytotoxicity in cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*, **76**, 257-270.
- Kaji, T., Mishima, A., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1993) Zinc protection against cadmium-induced destruction of the monolayer of cultured vascular endothelial cells. *Toxicol. Lett.*, **66**, 247-255.
- Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M., Kozuka, H. and Koizumi, F. (1994a) Suppression of plasminogen activator inhibitor type 1 release from cultured human umbilical vein endothelial cells by basic fibroblast growth factor. *Life Sci.*, **54**, 1563-1569.
- Kaji, T., Ohkawara, S., Inada, M., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1994b)

Cadmium stimulation of glycosaminoglycan synthesis by cultured vascular endothelial cells: comparison of various cell types. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 454-457.

Kaji, T., Suzuki, M., Yamamoto, C., Mishima, A., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1995) Severe damage of cultured vascular endothelial cell monolayer after simultaneous exposure to cadmium and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 168-172.

Kaji, T., Suzuki, M., Yamamoto, C., Imaki, Y., Miyajima, S., Fujiwara, Y., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1996a) Sensitive response of cultured vascular smooth-muscle cells to cadmium cytotoxicity: comparison with cultured vascular endothelial cells and kidney epithelial LLC-PK1 cells. *Toxicol. Lett.*, **89**, 131-137.

Kaji, T., Mishima, A., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Sakamoto, M., Kozuka, H. and Koizumi, F. (1996b) Bismuth induces metallothionein but does not protect against cadmium cytotoxicity in cultured vascular endothelial cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **56**, 630-634.

Kaji, T., Ohkawara, S., Nakajima, M., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Miyajima, S. and Koizumi, F. (1997) Lead-induced alteration of heparan sulfate proteoglycans in cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*, **118**, 1-10.

Kanthou, C., Parry, G., Wijelath, E., Kakkar, V. V. and Demoliou-Mason, C. (1992) Thrombin-induced proliferation and expression of platelet-derived growth factor-A chain gene in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **314**, 143-148.

Kinsella, M. G. and Wight, T. N. (1986) Modulation of sulfated proteoglycan synthesis by bovine aortic endothelial cells during migration. *J. Cell Biol.*, **102**, 679-687.

Kinsella, M. G., Tsoi, C. K., Järveläinen, H. T. and Wight, T. N. (1997) Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 318-325.

Kissane, J. M. and Robins, E. (1958) The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissue with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, **233**, 184-188.

Kojima, T., Shworak, N. W. and Rosenberg, R. D. (1992) Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat

- endothelial cell line. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4870-4877.
- Kok, F. J., van Duijn, C. M., Hofman, A., van der Voet, G. B., de Wolff, F. A., Paays, C. H. C. and Valkenburg, H. A. (1988) Serum copper and zinc and the risk of death from cancer and cardiovascular disease. *Am. J. Epidemiol.*, **128**, 352-359.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Levin, E. G. and Loskutoff, D. J. (1982) Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators. *J. Cell Biol.*, **94**, 631-636.
- Marcum, J. A. and Rosenberg, R. D. (1985) Heparinlike molecules with anticoagulant activity are synthesized by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 365-372.
- Marcum, J. A., Atha, D. H., Fritze, L. M., Nawroth, P., Stern, D. and Rosenberg, R. D. (1986) Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, **261**, 7507-7517.
- Mertens, G., Cassiman, J. J., van den Berghe, H., Vermynen, J. and David, G. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20435-20443.
- Moncada, S., Radomski, M. W. and Palmer, R. M. (1988) Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2495-2501.
- Murugesan, G., Chisolm, G. M. and Fox, P. L. (1993) Oxidized low density lipoprotein inhibits the migration of aortic endothelial cells in vitro. *J. Cell Biol.*, **120**, 1011-1019.
- Nader, H. B., Dietrich, C. P., Buonassisi, V. and Colburn, P. (1987) Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3565-3569.
- Niwa, A. and Suzuki, A. (1982) Effect of cadmium on the tension of isolated rat aorta (a possible mechanism for cadmium-induced hypertension). *J. Toxicol. Sci.*, **7**, 51-60.
- Novotny, W. F., Palmier, M., Wun, T. C., Broze, G. J. Jr. and Miletich, J. P. (1991) Purification and properties of heparin-releasable lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood*,

78, 394-400.

- Ochi, T., Otsuka, F., Takahashi, K. and Ohsawa, M. (1988) Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese hamster cells. *Chem. Biol. Interact.*, **65**, 1-14.
- Onosaka, S., Tanaka, K., Doi, M. and Okahara, K. (1978) A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissue. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **24**, 128-131.
- Oohira, A., Wight, T. N. and Bornstein, P. (1983) Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.*, **258**, 2014-2021.
- Ornitz, D. M., Yayon, A., Flanagan, J. G., Svahn, C. M., Levi, E. and Leder, P. (1992) Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 240-247.
- Petering, H. G. (1978) Some observations on the interaction of zinc, copper, and iron metabolism in lead and cadmium toxicity. *Environ. Health Perspect.*, **25**, 141-145.
- Probst, G. S., Bousquet, W. F. and Miya, T. S. (1977) Correlation of hepatic metallothionein concentrations with acute cadmium toxicity in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 61-69.
- Pukac, L. A., Ottlinger, M. E. and Karnovsky, M. J. (1992) Heparin suppresses specific second messenger pathways for protooncogene expression in rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3707-3711.
- Rapraeger, A. C., Krufka, A. and Olwin, B. B. (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, **252**, 1705-1708.
- Revis, N. W., Zinsmeister, A. R. and Bull, R. (1981) Atherosclerosis and hypertension induced by lead and cadmium ions: an effect prevented by calcium ion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6494-6498.
- Revtyak, G. E., Johnson, A. R. and Campbell, W. B. (1987) Prostaglandin synthesis in bovine coronary endothelial cells: comparison with other commonly studied endothelial cells. *Thromb. Res.*, **48**, 671-683.
- Rifkin, D. B. and Moscatelli, D. (1989) Recent developments in the cell biology of basic

- fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.*, **109**, 1-6.
- Roe, M. W., Hepler, J. R., Harden, T. K. and Herman, B. (1989) Platelet-derived growth factor and angiotensin II cause increase in cytosolic free calcium by different mechanisms in vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.*, **139**, 100-108.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L. (1974) A platelet-dependent serum factor stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1207-1210.
- Ross, R. and Glomset, J. A. (1976) The pathogenesis of atherosclerosis: II. *N. Engl. J. Med.*, **295**, 420-425.
- Ross, R., Raines, E. W. and Bowen-Pope, D. F. (1986) The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, **46**, 155-169.
- Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **362**, 801-809.
- Ruoslahti, E. and Yamaguchi, Y. (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, **64**, 867-869.
- Sa, G. and Fox, P. L. (1994) Basic fibroblast growth factor-stimulated endothelial cell movement is mediated by a pertussis toxin-sensitive pathway regulating phospholipase A₂ activity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3219-3225.
- Saksela, O., Moscatelli, D., Sommer, A. and Rifkin, D. B. (1988) Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell Biol.*, **107**, 734-751.
- Sato, Y. and Rifkin, D. B. (1988) Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J. Cell Biol.*, **107**, 1199-1205.
- Schanne, F. A., Gupta, R. K. and Rosen, J. F. (1992) Lead inhibits 1, 25-dihydroxyvitamin D-3 regulation of calcium metabolism in osteoblastic osteosarcoma cells (ROS 17/2.8). *Biochim. Biophys. Acta*, **1180**, 187-194.
- Schroeder, H. A. (1965) Cadmium as a factor in hypertension. *J. Chronic Dis.*, **18**, 647-656.
- Schwartz, J. (1991) Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men and women.

Environ. Health Perspect., **91**, 71-75.

- Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J. A., Fiddes, J. C. and Gospodarowicz, D. (1987) Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature*, **325**, 257-259.
- Shimada, K., Kusumoto, I. and Ozawa, T. (1985) The potency of heparin-like activity of glycosaminoglycans released by human endothelial cells in culture. *Experientia*, **41**, 671-673.
- Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M. A., Dikic, I., Ladbury, J. E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. and Lax, I. (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell*, **79**, 1015-1024.
- Stacey, N. H. and Klaassen, C. D. (1981) Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, **7**, 139-147.
- Tomera, J. F. and Harakal, C. (1986) Mercury- and lead-induced contraction of aortic smooth muscle in vitro. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **283**, 295-302.
- Wasteson, Å. (1971) Method for the determination of the molecular weight and molecular-weight distribution of chondroitin sulfate. *J. Chromatogr.*, **59**, 87-97.
- Wasteson, Å., Uthne, K. and Westermarck, B. (1973) A novel assay for the biosynthesis of sulphated polysaccharide and its application to studies on the effects of somatomedin on cultured cells. *Biochem. J.*, **136**, 1069-1074.
- Watts, S. W., Chai, S. and Webb, R. C. (1995) Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology*, **99**, 55-65.
- Webb, M. (1972) Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2767-2771.
- Weiss, R. H. and Maduri, M. (1993) The mitogenic effect of thrombin in vascular smooth muscle cells is largely due to basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.*, **268**, 5724-5727.
- Wilkins, G. M. and Leake, D. S. (1994) The oxidation of low density lipoprotein by cells or

- iron is inhibited by zinc. *FEBS Lett.*, **341**, 259-262.
- Yamaguchi, M., Oishi, H. and Suketa, Y. (1988) Zinc stimulation of bone protein synthesis in tissue culture. Activation of aminoacyl-tRNA synthetase. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 4075-4080.
- Yamaguchi M. and Hashizume, M. (1994) Effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on protein components in osteoblastic MC3T3-E1 cells: increases in osteocalcin, insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- β . *Mol. Cell. Biochem.*, **136**, 163-169.
- Yamamoto, C., Kaji, T., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1993) Cadmium stimulation of plasminogen activator inhibitor-1 release from human vascular endothelial cells in culture. *Toxicology*, **83**, 215-223.
- Yamamoto, C., Kaji, T., Furuya, M., Sakamoto, M., Kozuka, H. and Koizumi, F. (1994) Basic fibroblast growth factor suppresses tissue plasminogen activator release from cultured human umbilical vein endothelial cells but enhances that from cultured human aortic endothelial cells. *Thromb. Res.*, **73**, 255-263.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-415.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P. and Ornitz, D. M. (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, **64**, 841-848.